

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LUCIANE MARIA LASKOSKI

**CINÉTICA LEUCOCITÁRIA E ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADOS ÀS  
LESÕES LAMINARES EM CAVALOS COM AFECÇÕES  
GASTRINTESTINAIS**

CURITIBA

2016

LUCIANE MARIA LASKOSKI

**CINÉTICA LEUCOCITÁRIA E ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADOS ÀS  
LESÕES LAMINARES EM CAVALOS COM AFECÇÕES  
GASTRINTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

CURITIBA

2016

**L345** Laskoski, Luciane Maria

Cinética leucocitária e estresse oxidativo relacionados às lesões  
laminares em cavalos com afecções gastrintestinais. / Luciane Maria  
Laskoski. – Curitiba : 2016.  
121 f. il.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

1. Equino - Doenças. 2. Laminite. I. Dittrich, Rosangela Locatelli.  
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619.6:636.1

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada **“CINÉTICA LEUCOCITÁRIA E ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADOS À LESÕES LAMINARES EM CAVALOS COM AFECÇÕES GASTROINTESTINAIS”** apresentada pela Doutoranda **LUCIANE MARIA LASKOSKI** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 16 de março de 2016

Professora Doutora Rosângela Locatelli Dittrich  
Presidente

Professor Doutor Rafael Resende Faleiros  
Membro

Professor Dr. Gervásio Henrique Bechara  
Membro

Professor Doutor Ivan Deconto  
Membro

Professor Doutor Peterson Triches Dornbusch  
Membro

Dedico esta tese àquele que ensinou os princípios mais importantes da minha vida.

A meu pai, João Laskoski.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as graças que tem me concedido. A Ele agradeço por todas as pessoas com quem convivi nestes quatro anos. A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram não só para o desenvolvimento da minha tese, mas também para o meu amadurecimento como ser humano.

À profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, por toda a paciência, dedicação e carinho com que conduziu impecavelmente, tanto profissional quanto pessoalmente, a minha orientação nestes quatro anos de doutorado.

Ao prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, pela co-orientação e auxílio prontamente disponíveis em tudo o que solicitei, desde o meu mestrado.

Ao prof. Dr. Ivan Deconto, por contribuir diretamente para a minha formação e conhecimento geral sobre a laminite, e por se tornar um grande amigo e companheiro.

Ao prof. Msc. Renato Silva de Sousa, por permitir que eu desenvolvesse a parte prática do meu experimento no laboratório de Patologia Veterinária, auxiliando na padronização da técnica de imuno-histoquímica e histopatologia dos órgãos.

À profa. Dra. Juliana Sperotto Brum, por toda a ajuda e companheirismo, especialmente na elaboração dos trabalhos científicos.

Ao prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira, agradeço por compartilhar seu conhecimento sobre estatística, filosofia, política, língua inglesa, dentre outros, e por poder contar com sua amizade e ajuda.

Aos professores Dr. Ivan Roque de Barros Filho e Dr. Peterson Triches Dornbusch pela participação em meu comitê de orientação, por todo o conhecimento que sempre compartilharam, e pela disponibilidade e boa vontade com que me auxiliaram neste doutorado.

Aos queridos residentes de clínica e cirurgia de grandes animais, Monalisa, Frederico, Jéssica e Fernando, pelos momentos de trabalho que compartilhamos juntos e ajuda durante a coleta de amostras. Aos residentes do laboratório de Patologia Clínica, Tieme, Hagi e Carlos pelo auxílio na realizações das análises clínicas. Aos residentes Kamila, Yara e Thierry pelas coletas e emblocagem de amostras teciduais. Agradeço também aos residentes que não

participaram diretamente do meu trabalho, Júlia e Eduarda, Luciana, Cláudia e Daniel, Daniele e Gabriela, e a todos os meus colegas do laboratório de patologia clínica, especialmente a Marília, Patrícia e Harald. A todos vocês agradeço também pelo convívio harmonioso durante estes quatro anos.

Ao técnico e amigo Msc. Olair Beltrame, pela ajuda com as análises laboratoriais e preparo de soluções para imuno-histoquímica.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária da UFPR e também aos do Departamento de Medicina Veterinária, por todo o conhecimento transmitido.

Ao prof. Dr. Rafael Resende Faleiros, que sempre me orientou indiretamente na pesquisa sobre laminite. Agradeço por toda a confiança no desenvolvimento do meu trabalho e por ser um grande exemplo profissional para a minha formação.

Aos colegas de docência da Universidade de Cuiabá, que me auxiliaram no início da coleta das amostras, em especial à Msc. Mariana Bueno Carvalho.

À minha amiga Márcia H. M. Albuquerque, por todo o companheirismo na graduação e também pós graduação, e por me convidar para ser madrinha de seu bem mais precioso, o Rafinha.

À secretária da pós graduação, Maria José Botelho, por todo o auxílio prestado sempre de forma impecável.

Às amigas, Camila, Flávia, Cristiane, Kethrim e Mônica, pelos momentos de descontração, fundamentais nestes quatro anos.

Aos funcionários Dorli, Benedito e Luiz, por serem sempre muito prestativos e de convívio agradável durante todo o meu trajeto acadêmico.

Às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Leonor, meu pai João (*in memorian*), minhas irmãs Renata e Lorena, meu irmão Tiago (*in memorian*) e a minha afilhada sobrinha, Rafaela. Obrigada por serem meu alicerce, por todo o apoio, amor incondicional e força em momentos difíceis. Sem vocês, nada do que realizei seria possível.

À CAPES, pela bolsa de estudo para realização do doutorado.

"Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio, e eis que a verdade se revela"

**Albert Einstein**



## RESUMO

A fisiopatogenia da laminite é parcialmente conhecida, o que dificulta a pesquisa de tratamentos eficazes na fases prodrômica e aguda da afecção. O objetivo deste estudo foi identificar se a leucopenia, infiltração leucocitária laminar e o estresse oxidativo estão associados ao desenvolvimento de lesões laminares em cavalos com afecções gastrintestinais. Foram utilizados 37 cavalos, sendo seis saudáveis, 24 com afecções gastrintestinais letais de origem natural e sete cavalos com endotoxemia e isquemia intestinal induzidas experimentalmente. Foram coletadas amostras de tecido laminar, coração, fígado, pulmão, rim, cérebro e cerebelo para histopatologia e imuno-histoquímica. Amostras de sangue total foram coletadas somente de cavalos com síndrome cólica natural em até seis horas antes do óbito para realização do hemograma. O estudo foi dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo é uma revisão de literatura sobre a laminite; o capítulo II aborda a relação da leucopenia com lesões laminares e a infiltração leucocitária pela imunomarcagem para calprotectina em cavalos saudáveis (grupo controle, n=6) e 18 cavalos com afecções gastrintestinais naturais, divididos em dois grupos: leucopênicos (n=7) e não leucopênicos (n=11); o capítulo III demonstra as imunomarcações para nitrotirosina e superóxido dismutase no tecido laminar do casco de cavalos hígidos (grupo controle, n=6) e de cavalos com afecções gastrintestinais (grupo doenças gastrintestinais, n=24); o capítulo IV aborda a presença e relação do estresse oxidativo sistêmico, lesões laminares, imunomarcagem para nitrotirosina no casco, superóxido dismutase laminar e em múltiplos órgãos em cavalos com afecções gastrintestinais naturais e cavalos com indução experimental de endotoxemia e isquemia intestinal, divididos em dois grupos de acordo com a intensidade de imunomarcagem em múltiplos órgãos para nitrotirosina: grupo lesão oxidativa (n=14) e grupo sem lesão oxidativa (n=7). Observou-se que dos 18 cavalos com síndrome cólica letal, somente em três não verificou-se lesões laminares, e que estas ocorreram na ausência de sinais clínicos; a leucopenia verificada está associada ao aumento de infiltração leucocitária laminar; as imunomarcações laminares para nitrotirosina e superóxido dismutase estão presentes somente nos cavalos com afecções gastrintestinais e não nos saudáveis, indicando que o estresse oxidativo pode estar associado ao desenvolvimento de laminite; a presença de estresse oxidativo sistêmico, com imunomarcagem moderada a forte para nitrotirosina nos órgãos, está associada ao agravamento das lesões laminares nos cavalos com doenças gastrintestinais, com menor expressão laminar da superóxido dismutase quando comparada aos outros órgãos. Conclui-se que a leucopenia está associada ao aumento da infiltração leucocitária laminar; a lesão laminar pode ser agravada por substâncias oxidantes presentes no tecido laminar na fase de desenvolvimento, e que o estresse oxidativo sistêmico contribui para o agravamento destas lesões em cavalos com afecções gastrintestinais.

**Palavras-chaves:** Laminite. Imuno-histoquímica. Histopatologia. Nitrotirosina. Superóxido dismutase. Calprotectina.

## ABSTRACT

The pathogenesis of laminitis is partially known, making it difficult to search for effective treatments in the prodromal or acute phase of the disease. The objective of this study were to identify if the leukopenia, laminar leukocyte infiltration and oxidative stress are associated with the development of laminar lesions in horses with gastrointestinal disorders. Thirty seven horses, being six healthy animals, 24 with lethal gastrointestinal disorders naturally occurring and seven horses with endotoxemia and intestinal ischemia induced experimentally were used throughout the study. Hoof laminar tissue and samples of heart, liver, lung, kidney, brain and cerebellum were collected for histopathology and immunohistochemistry. Blood samples were collected only in horses with natural colic syndrome within six hours before death for complete blood count. The study was divided into four sections. The section I brings a literature revision about laminitis; the section II approaches the relation between leucopenia and laminar lesions and leukocyte infiltration by calprotectin immunostaining in healthy horses (control group, n=6) and 18 horses with natural gastrointestinal disorders, distributed into two groups: leukopenic (n=7) and non leukopenic (n=11); the section III shows the immunostaining for nitrotyrosine and superoxide dismutase in hoof laminar tissue of healthy horses (control group, n=6) and in horses with natural gastrointestinal disorders (gastrointestinal disorders group, n=24); the section IV approaches the presence and the relation of systemic oxidative stress, laminar lesions, immunostaining for nitrotyrosine in the hoof and superoxide dismutase in the hoof and in organs of horses with natural gastrointestinal disorders and in horses with endotoxemia and experimentally induced intestinal ischaemia, distributed into two groups according with the immunostaining intensity for nitrotyrosine in multiple organs: oxidative lesion group (n=14) and non oxidative lesion group (n=7). It was observed only three out 18 horses with lethal colic syndrome did not present laminar lesions, and that it occurs in the absence of clinical signs; the leukopenia was associated to increase of laminar leukocyte infiltration, and that the laminar immunostaining for nitrotyrosine and superoxide dismutase occurred only in horses with gastrointestinal diseases and not in healthy, indicating that oxidative stress may be correlated with the laminitis development; the presence of systemic oxidative stress, with moderate to strong immunostaining for nitrotyrosine in all organs, is associated to aggravation of laminar lesions in horses with gastrointestinal diseases, with lower laminar expression of superoxide dismutase when compared to other organs. It can be concluded that leukopenia is associated to increase of laminar leukocyte infiltration; the laminar lesions can be aggravated for oxidant substances present in the laminae in the development phase and that the organic oxidative stress contribute to aggravation of lesions.

**Key words:** Laminitis. Immunohistochemistry. Histopathology. Nitrotyrosine. Superoxide dismutase. Calprotectin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – Fotomicrografia do tecido laminar de equino hígido, demonstrando as interdigitações entre lâminas epidérmicas e dérmicas. Observa-se lâminas epidérmicas secundárias (LES) arredondadas e adequadamente interdigitadas com o tecido dérmico e núcleos das células basais (setas) alongados. LEP: lâmina epidérmica primária; LDP: lâmina dérmica primária.....29

### CAPÍTULO II

- FIGURA 1 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar dos animais do GL, cada cavalo com quatro membros; N=sete cavalos. Legenda: identificação do cavalo (números 1-7); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.....63
- FIGURA 2 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar dos animais do GNL, cada cavalo com quatro membros com exceção do animal 11\*, com amostras somente dos membros torácicos; N=11 cavalos. Legenda: identificação dos cavalos (1-11); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.....63
- FIGURA 3 – Fotomicrografia do tecido laminar do casco. Escores de lesão laminar. A. Escore 0, lâminas epidérmicas secundárias (LES) arredondadas e interdigitadas com as lâminas dérmicas secundárias (LDS). Membrana basal (MB) com contorno definido (setas, GC, PAS). B. Escore 3, destruição das interdigitações, com aumento da distância entre o eixo queratinizado das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e a MB (setas, GL, HE). C. Escore 3, destruição das interdigitações formadas entre as LES e LDS (setas, GNL, HE). D. Escore 3, ausência da MB em alguns segmentos (setas, GL, PAS). LES: lâmina epidérmica secundária; LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; MB: membrana basal; HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff.. .....64
- FIGURA 4 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes graus de infiltração leucocitária dos animais do GL, cada cavalo com quatro membros; N=sete cavalos. Legenda: Identificação dos cavalos (1-7); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.....66
- FIGURA 5 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes graus de infiltração leucocitária dos animais do GNL, cada cavalo com quatro membros com exceção do animal 11\*, com amostras somente dos

membros torácicos. N=11. Legenda: identificação dos cavalos (1-11); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.....66

- FIGURA 6 – Fotomicrografia do tecido laminar do casco. Imuno-histoquímica para calprotectina. A. Grau 1, imunomarcacão de leucócitos em vasos sanguíneos (setas) dentro do tecido dérmico (GL). B. Grau 2, infiltração leucocitária no tecido dérmico (setas, GL). C. Grau 3, infiltração entre as interdigitações (setas espessa) e imunomarcacão disseminada no tecido epidérmico (setas afiladas, GNL). D. Grau 3, imunomarcacão disseminada no tecido epidérmico (setas, GL). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; LES: lâmina epidérmica secundária.....67

### CAPÍTULO III

- FIGURA 1 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar observados nos animais do GDG (n=24, cada cavalo com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).....81
- FIGURA 2 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de imunomarcacão para nitrotirosina observados nos animais do GDG (n=24, cada cavalo com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).....82
- FIGURA 3 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de imunomarcacão para SOD2 observados nos animais do GDG (n=24, cada cavalo com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).....83
- FIGURA 4 – Figura 4 – Fotomicrografia do tecido laminar de cavalos (GDG). Imuno-histoquímica para nitrotirosina. A. Escore 1, imunomarcacão de leucócitos em vasos sanguíneos (área magnificada) localizados na lâmina dérmica. B. Escore 2, imunomarcacão de leucócitos, células endoteliais e resíduos de nitrotirosina (área magnificada, setas), localizados entre as lâminas dérmicas e epidérmicas. C e D. Escore 3, imunomarcacão disseminada entre as interdigitações formadas pelas lâminas dérmicas e epidérmicas (setas). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; LES: lâmina epidérmica secundária.....85
- FIGURA 5 – Fotomicrografia do tecido laminar de cavalos (GDG). Imuno-histoquímica para SOD2. A. Escore 0, sem imunomarcacão (negativa). B. Escore 1, imunomarcacão de fraca intensidade na extremidade das lâminas epidérmicas (área magnificada, setas).

C. Escore 2, imunomarcção de intensidade moderada na extremidade das lâminas epidérmicas (área magnificada, setas).  
D. Escore 3, imunomarcção de forte intensidade em toda a lâmina epidérmica (área magnificada, setas). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; LES: lâmina epidérmica secundária.....86

## CAPÍTULO IV

FIGURA 1 – Gráfico de dispersão dos escores de lesão laminar dos cavalos dos grupos GSLO e GLO, cada animal com quatro membros... 102

FIGURA 2 – Fotomicrografia dos órgãos de cavalos com doenças gastrintestinais. Imuno-histoquímica para nitrotirosina. A. Pulmão. A1. Observa-se imunomarcção de fraca intensidade no citoplasma de células do epitélio bronquiolar (setas, GSLO). A2. Há intensa imunomarcção no septo interalveolar (setas, GLO). B. Rim. B1. Imunomarcção de fraca intensidade no citoplasma do epitélio tubular renal (setas, GSLO). B2. Forte imunomarcção no citoplasma do epitélio tubular renal (setas, GLO). C. Fígado. C1. Imunomarcção de fraca intensidade no citoplasma de hepatócitos (setas, GSLO). C2. Observa-se imunomarcção de forte intensidade em sinusóides. Na veia centrolobular, há imunomarcção de resíduos de nitrotirosina e células inflamatórias (setas, GLO). D. Coração. D1. Ausência de imunomarcção em cardiomiócitos (GSLO). D2. Há imunomarcção positiva em núcleo de cardiomiócitos (setas, GLO). E. Cerebelo. E1. Ausência de imunomarcção entre as camadas granulosa, de neurônios de Purkinje e molecular do cerebelo (GSLO). E2. Observa-se imunomarcção positiva no pericário dos neurônios de Purkinje e pelo neurópilo (GLO)..... 103

FIGURA 3 – Fotomicrografia dos órgãos de cavalos com doenças gastrintestinais. Imuno-histoquímica para SOD2. A Pulmão. Imunomarcção de forte intensidade em epitélio bronquial (A1) e bronquiolar (A2, setas, GLO). B. Rim. B1. Imunomarcção de moderada intensidade em epitélio tubular renal (setas, GSLO). B2. Imunomarcção de forte intensidade em epitélio tubular renal (setas, GLO). C. Fígado. C1. Imunomarcção de moderada intensidade em sinusóides (setas, GSLO). C2. Imunomarcção de forte intensidade em sinusóides (setas, GLO). D. Coração. D1. Imunomarcção de moderada intensidade em sarcoplasma (setas, GLO). D2. Imunomarcção de forte intensidade em sarcoplasma (setas, GLO). E1. Cerebelo. Imunomarcção de moderada intensidade em neurônios de Purkinje (setas, GLO). E2. Cérebro. Imunomarcção de moderada intensidade em pericário de neurônios (setas, GLO)..... 106

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- TABELA 1 – Características morfológicas das lesões do tecido laminar, adaptado de POLLITT (1996).....59
- TABELA 2 – Graus de imunomarcção leucocitária.....60
- TABELA 3 – Medianas, valores mínimos e máximos do número de leucócitos totais no sangue, escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária laminar entre os grupos experimentais. Medianas com a mesma letra nas colunas não apresentam diferença significativa entre si. ....68

### CAPÍTULO III

- TABELA 1 – Escores de imunomarcção para nitrotirosina no tecido laminar.....79
- TABELA 2 – Escores de imunomarcção para SOD no tecido laminar.....80
- TABELA 3 – Medianas e amplitude inter-quartis para os escores de lesão laminar e imunomarcações de nitrotirosina e SOD2 em cavalos dos grupos GC e GDG ( $p < 0,05$ ). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística.....83

### CAPÍTULO IV

- TABELA 1 – Medianas e amplitude inter-quartis para os escores de lesão laminar e imunomarcção para nitrotirosina e SOD2 laminar e SOD2 em múltiplos órgãos, nos grupos experimentais GSLO e GLO ( $p < 0,05$ ). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa.....101

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

ADN	–	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	–	Produtos finais de glicação avançada
CAPES	–	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CB	–	Célula basal
DAB	–	Diaminobenzidina
DAMPs	–	Padrões moleculares associados ao dano
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
FCAV	–	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
GC	–	Grupo Controle
GDG	–	Grupo doenças gastrintestinais
GL	–	Grupo Leucopênicos
GLO	–	Grupo lesão oxidative
GNL	–	Grupo não leucopênicos
GSLO	–	Grupo sem lesão oxidative
HE	–	Hematoxilina e eosina
HNE	–	4-hidroxinonenal
LDP	–	Lâmina dérmica primária
LDS	–	Lâmina dérmica secundária
LEP	–	Lâmina epidérmica primária
LES	–	Lâmina epidérmica secundária
LPS	–	Lipopolissacarídeos
MB	–	Membrana basal
MMP	–	Metaloproteinases
NGAL	–	Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos
PAMPs	–	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	–	Ácido periódico de Schiff
PD	–	Membro pélvico direito
PE	–	Membro pélvico esquerdo
PPID	–	Disfunção da pars intermédia da pituitária
SC	–	Sinais clínicos
SOD	–	Superóxido dismutase

SRIS	–	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TD	–	Membro torácico direito
TE	–	Membro torácico esquerdo
TNF- $\alpha$	–	Fator de necrose tumoral alfa
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I. ATUALIZAÇÃO SOBRE LAMINITE.....</b>	<b>25</b>
2.1	INTRODUÇÃO.....	25
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE LAMINITE....	26
2.3	ACHADOS ANATOMO-PATOLÓGICOS .....	28
2.4	ACHADOS CLÍNICOS .....	30
2.5	FISIOPATOGENIA.....	32
2.5.1	Mecanismos Isquêmicos .....	32
2.5.2	Mecanismos Enzimáticos .....	34
2.5.3	Mecanismos Endócrinos ou Metabólicos.....	35
2.5.4	Mecanismos Inflamatórios .....	36
2.5.5	Estresse Oxidativo .....	38
2.5.6	Apoptose.....	39
2.6	TRATAMENTO.....	40
2.7	CONCLUSÃO.....	42
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II. LEUCOPENIA, INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA LAMINAR E LESÕES LAMINARES EM CAVALOS COM SÍNDROME CÓLICA DE OCORRÊNCIA NATURAL.....</b>	<b>54</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	55
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.2.1	Comissão de Ética.....	57
3.2.2	Animais.....	57
3.2.3	Hemograma.....	57
3.2.4	Grupos Experimentais.....	58
3.2.4.1	Grupo Controle (GC).....	58
3.2.4.2	Grupo Leucopênicos (GL).....	58
3.2.4.3	Grupo Não Leucopênicos (GNL).....	58
3.2.5	Doenças Gastrintestinais Letais.....	58

3.2.6	Morfologia do Tecido Laminar.....	58
3.2.7	Imuno-Histoquímica para Calprotectina.....	59
3.2.8	Análises Estatísticas.....	60
3.3	RESULTADOS.....	60
3.3.1	Doenças Gastrintestinais.....	60
3.3.2	Hemograma.....	61
3.3.3	Morfologia do Tecido Laminar.....	62
3.3.4	Imunomarcção para Calprotectina.....	65
3.3.5	Correlação entre o Número de Leucócitos Totais, Escores de Lesão Laminar e Graus de Infiltração Leucocitária .....	68
3.4	DISCUSSÃO.....	68
3.5	CONCLUSÃO.....	71
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III. ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE CAVALOS COM AFECÇÕES GASTRINTESTINAIS LETAIS .....</b>	<b>74</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	75
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.2.1	Comissão de Ética.....	77
4.2.2	Animais.....	77
4.2.3	Delineamento Experimental.....	78
4.2.3.1	Grupo Controle (GC).....	78
4.2.3.2	Grupo Doenças Gastrintestinais (GDG).....	78
4.2.4	Morfologia do Tecido Laminar.....	78
4.2.5	Imuno-Histoquímica para Nitrotirosina e SOD2.....	78
4.2.6	Análises Estatísticas .....	80
4.3	RESULTADOS.....	80
4.4	DISCUSSÃO.....	86
4.5	CONCLUSÃO.....	89
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>

<b>5</b>	<b>CAPÍTULO IV. LESÕES LAMINARES EM EQUINOS SOB ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO, ACOMETIDOS POR AFECÇÕES GASTRINTESTINAIS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE OU DE OCORRÊNCIA NATURAL..</b>	<b>94</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	95
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	97
5.2.1	Animais.....	97
5.2.2	Delineamento Experimental.....	97
5.2.2.1	Indução Experimental de Isquemia Intestinal e Endotoxemia ...	97
5.2.2.2	Doenças Gastrintestinais Naturais.....	98
5.2.3	Amostras Teciduais e Histopatologia.....	98
5.2.4	Imuno-Histoquímica para Nitrotirosina e SOD2.....	98
5.2.5	Grupos Experimentais.....	99
5.2.5.1	Grupo Sem Lesão Oxidativa (GSLO).....	99
5.2.5.2	Grupo Lesão Oxidativa (GLO).....	100
5.2.6	Análises Estatísticas.....	100
5.3	RESULTADOS.....	100
5.3.1	Grupos Experimentais.....	100
5.3.2	Avaliação Histopatológica.....	100
5.3.3	Imunomarcacão para Nitrotirosina.....	102
5.3.4	Imunomarcacão para SOD2.....	104
5.4	DISCUSSÃO.....	107
5.5	CONCLUSÃO.....	111
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A laminite é uma grave doença podal que acomete cavalos, causando intenso desconforto ao animal e desgaste financeiro e emocional ao proprietário. Após o aparecimento dos sinais clínicos e desenvolvimento da rotação e/ou afundamento da falange distal, o tratamento da laminite pode ser extremamente longo, exigindo muitos cuidados de enfermagem e casqueamento. Mesmo que todas as recomendações sejam realizadas, alguns casos são refratários ao tratamento, momento em que a eutanásia é indicada para não prolongar o sofrimento do cavalo.

O tecido laminar do casco é constituído por interdigitações formadas pelo tecido dérmico e epidérmico, os quais possuem lâminas primárias e secundárias, unidas pela membrana basal (POLLITT, 1996). A anatomopatologia do casco afetado pela laminite é avaliada com base nas alterações características da laminite. Macroscopicamente, as alterações são visualizadas pela deformação do casco e rotação e/ou afundamento da falange distal na fase crônica, e microscopicamente, pelas mudanças morfológicas do tecido laminar, que iniciam já na fase prodrômica, mesmo antes da manifestação clínica da laminite (POLLITT, 1996; LASKOSKI *et al.*, 2009).

Nas fases prodrômica e aguda da laminite os tratamentos realizados são mais eficazes, especialmente a crioterapia, a qual é uma medida pouco prática para emprego na maioria das propriedades de criação e manejo de equinos. Para que tratamentos de mais fácil utilização a campo sejam pesquisados, é necessário entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento do quadro. Apesar de inúmeras pesquisas serem realizadas há décadas com este intuito, ainda não se sabe exatamente quais os fatores causadores da laminite. Várias teorias estão descritas para tentar explicar a fisiopatogenia da laminite.

A primeira hipótese para o aparecimento das lesões laminares é de que a vasoconstrição cause isquemia no tecido laminar do casco (NOSCHKA *et al.*, 2009), ou que a mesma seja decorrente de microtrombos presentes nos pequenos vasos (WEISS *et al.*, 1994). A teoria enzimática também foi descrita, postulando que enzimas capazes de degradar a matriz de colágeno presente na membrana basal destruiriam a união das lâminas dérmicas e epidérmicas

(POLLITT, 1999). A teoria endocrinopática tem o objetivo de explicar a laminite que ocorre em cavalos obesos, com disfunção da pars intermédia da pituitária e após longas dosagens de corticoides (JOHNSON, 2002; RYU *et al.*, 2004; DE LAAT *et al.*, 2010). E a teoria inflamatória aponta o envolvimento de mediadores inflamatórios, liberados durante a resposta inflamatória sistêmica, e infiltração leucocitária laminar levando ao desenvolvimento de lesão laminar (HURLEY *et al.*, 2006; LOFTUS *et al.*, 2007, FALEIROS *et al.*, 2009). O estresse oxidativo também tem sido pesquisado como causador das lesões laminares (YIN *et al.*, 2009; BURNS *et al.*, 2011). As lesões oxidativas ocorrem quando existe um aumento da quantidade de oxidantes, como o peroxinitrito, que causam lesão oxidativa superior a capacidade de neutralização tecidual por agentes antioxidantes, como a superóxido dismutase (BECKMAN *et al.*, 1990; MACDONALD *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2004).

A laminite apresenta similaridades com a disfunção de múltiplos órgãos que ocorre na sepse ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), bem descrita na medicina humana (BELKNAP *et al.*, 2009). A laminite pode ocorrer após episódios graves de síndrome cólica, pleuropneumonia, prolapso uterino, dentre outras afecções que podem desenvolver a SRIS (PARSONS *et al.*, 2007; BELKNAP *et al.*, 2009).

O estudo da laminite tem sido realizado por indução da doença com a utilização de modelos experimentais. O modelo clássico utiliza o amido de milho, causando sobrecarga por carboidratos, substituído atualmente pela oligofrutose (WEISS *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2013). O extrato de noqueira preta causa desconforto podal transitório e lesões laminares sutis (FALEIROS *et al.*, 2009). Há ainda o modelo endocrinopático, obtido pela administração de insulina (DE LAAT *et al.*, 2010). A sobrecarga por carboidratos é o modelo que mais se aproxima da laminite inflamatória natural, por possuir uma fase bem documentada de endotoxemia e sinais clínicos de sepse na fase prodrômica da doença, além de induzir alterações laminares intensas (GARNER *et al.*, 1975; LEISE *et al.*, 2011). Modelos experimentais utilizando cavalos com afecções gastrintestinais induzidas experimentalmente também têm sido utilizados (RIO TINTO *et al.*, 2004; LASKOSKI *et al.*, 2010), no entanto, com poucas informações disponíveis para comparar com os demais modelos experimentais.

Existem muitas diferenças quanto aos resultados observados nos modelos tradicionais de indução de laminite. A presença da leucopenia, que é um sinal clínico importante da SRIS, é observada somente no modelo de laminite por extrato de noqueira preta, ocorrendo 3-4 horas após a administração da substância (BELKNAP *et al.*, 2009; NOSCHKA *et al.*, 2009). A infiltração leucocitária laminar neste modelo ocorre anteriormente, iniciando 1 hora e 30 minutos após a indução (LOFTUS *et al.*, 2007), diferente também do observado no modelo experimental por carboidratos (FALEIROS *et al.*, 2011). Desta forma, a utilização de afecções gastrintestinais como indutoras da lesão podal pode ser uma importante ferramenta para entender quais mecanismos estão de fato implicados no desenvolvimento da laminite secundária à síndrome cólica.

Os objetivos deste estudo foram investigar a associação de alterações no número de leucócitos totais, infiltração leucocitária laminar e o estresse oxidativo laminar e sistêmico, com o desenvolvimento de lesões laminares em cavalos com afecções gastrintestinais.

Esta tese está dividida em quatro capítulos, sendo o primeiro uma revisão bibliográfica sobre laminite, e os outros três oriundos dos resultados obtidos no estudo, cujos títulos são:

- Capítulo I. "Atualização sobre laminite"
- Capítulo II. "Leucopenia, avaliação da infiltração leucocitária laminar e lesões laminares em cavalos com síndrome cólica de ocorrência natural"
- Capítulo III. "Estresse oxidativo no tecido laminar do casco de cavalos com doenças gastrintestinais letais"
- Capítulo IV. "Lesões laminares em cavalos com estresse oxidativo sistêmico após doenças gastrintestinais de ocorrência natural ou induzidas experimentalmente"

No primeiro capítulo foi realizada uma revisão sobre a fisiopatogenia e tratamento da laminite. No segundo capítulo, objetivou-se detectar a associação da leucopenia com a infiltração leucocitária e lesões no tecido laminar do casco de cavalos com afecções gastrintestinais naturais. A finalidade do terceiro capítulo foi de identificar a presença de imunomarcagem para nitrotirosina e superóxido dismutase em cavalos saudáveis e cavalos com afecções gastrintestinais naturais. O capítulo IV foi elaborado com o intuito de pesquisar a relação do estresse oxidativo em múltiplos órgãos em cavalos com afecções

gastrintestinais com a gravidade das lesões laminares, bem como a intensidade de imunomarcção para superóxido dismutase em múltiplos órgãos e no tecido laminar.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M.N.; PIACENZA, L.; IRIGO, F.; PELUFFO, G.; RAFAEL RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 222–232, 2004.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.155-157, 2009.

BURNS, T.A.; WESTERMAN, T.; NUOVO, G.J.; WATTS, M.R.; PETTIGREW, A.; YIN, C.; BELKNAP, J.K. Role of Oxidative Tissue Injury in the Pathophysiology of Experimentally Induced Equine Laminitis: A Comparison of 2 Models. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 540-548, 2011.

DE LAAT, M.A.; MCGOWAN, C.M.; SILENCE, M.N.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinemia in Standard bred horses. **Equine Veterinary Journal**, v.42, p.129-135, 2010.

FALEIROS, R.R.; NUOVO, G.J.; BELKNAP, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.1, p.174-181, 2009

FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J.; MESSER, N.T.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.107-115, 2011.

GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R.; HAHN, A.W.; HUTCHESON, D.P.; TUMBLESON, M.E. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 441–444, 1975.

HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J.; DONOVAN, D.C.; OKINAGA, T.; VANDENPLAS, M.L.; PERONI, J.F.; MOORE, J.N. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, n.3-4, p.195-206, 2006.

JOHNSON, P.J. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v.18, n.2, p.271-293, 2002

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; PEREIRA, R.N.; URIBE DIAS, A.D.P.; ALESSI, A.C. Morphologic alterations of the hoof lamellar tissue, and clinic and laboratorial analyses of horses with lethal colic syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.731-735, 2009.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; SOUZA, A.H.; FALEIROS, R.R.; AMORIM, R.L. Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1331-1339, 2010.

LIMA, L.R.; MENDES, H.M.F.; MAGALHÃES, J.F.; MARKOWICZ, L.C.; CAVALCANTI, C.B.; PAES LEME, F.O.; TEIXEIRA, M.M.; FALEIROS, R.R. Clinical and hematologic equine laminitis subjected to a model oligofructose, treated or not with a receptor antagonist agent CXCR1/2. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.8, p.992-998, 2013.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A.; ABRAHAMSEN, E.J.; BELKNAP, J.K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.11, p.1205-1211, 2007.

MACDONALD, J.H.F.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, p. 221-232, 2003.

NOSCHKA, E.; MOORE, J.N.; PERONI, J.F.; LEWIS, S.J.; MORROW, J.D.; ROBERTSON, T.P. Thromboxane and isoprostanes as inflammatory and vasoactive mediators in black walnut heartwood extract induced equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, n.3-4, p.200-210, 2009.

PARSONS, C.S.; ORSINI, J.A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997-2004). **Journal of American Veterinary Medical Association** v. 230, p. 885-889, 2007.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.38-46, 1996.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v.45, p.188-192, 1999.

RIO TINTO, J.J.M.; ALVES, G.E.S.; FALEIROS, R.R.; SATOS, R.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; MELO, E.G. Use of hydrocortisone in horses subjected to ischemia and reperfusion in the jejunum and its consequences under the laminar



corium. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.56, n.3, p.292-299, 2004.

RYU, S.; KIM, B.S.; LEE, C.W.; YOON, J.; LEE, Y.L. Glucocorticoide-induced laminitis with hepatopathy in a thoroughbred filly. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.3, p.271-274, 2004.

WEISS, D.J.; GEOR, R.J.; JOHNSTON, G.; TRENT, A.M. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.5, p.606-612, 1994.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; MCCLENAHAN, D.; FAGLIARI, J.J.; JENKINS, K. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.12, p.1376-1380, 1997.

YIN, C.; PETTIGREW, A.; LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 211-215, 2009.

## 2 CAPÍTULO I. ATUALIZAÇÃO SOBRE LAMINITE

### RESUMO

A laminite é uma grave afecção podal, que permanece com fisiopatogenia parcialmente conhecida. Sabe-se que mecanismos isquêmicos, enzimáticos, metabólicos e inflamatórios estão envolvidos no desenvolvimento das lesões laminares. No entanto, poucas medidas terapêuticas são eficazes para prevenir ou controlar a gravidade da laminite nas fases prodrômica e aguda, o que frequentemente determina sérias complicações como rotação e/ou afundamento da falange distal e até mesmo perda do estojo córneo. Este trabalho teve como objetivo compilar os conhecimentos atuais sobre a fisiopatologia e tratamento da laminite em equinos.

**Palavras-chave:** Equino. Fisiopatogenia. Tratamento. Doença podal.

### AN UPTADE ABOUT LAMINITIS

### ABSTRACT

Laminitis is a severe podal disorder, which pathophysiology remains partially known. Ischemic, enzymatic, metabolic and inflammatory mechanisms are connected to the development of laminar lesions. However, few therapeutic measures are effective to prevent or control the severity of acute laminitis and its prodromal stage, which often determines serious complications such as rotation and/or sinking of the distal phalanx and even the loss of hoof. The purpose of this study was to compile the actual knowledge in respect to the pathophysiology and treatment of equine laminitis.

**Key words:** Horse. Pathophysiology. Treatment. Podal disease.

### 2.1 INTRODUÇÃO

A laminite é uma das mais devastadoras doenças que acometem equinos, sendo a segunda maior causa de morte nestes animais. O desconforto podal causado é tão intenso, que muitos proprietários optam pelo sacrifício do cavalo após tentativas fracassadas de tratamento.

A grande dificuldade de se estabelecer um tratamento adequado para a laminite ocorre porque a doença ainda não possui fisiopatogenia conhecida. É uma das afecções mais estudadas em cavalos, concentrando grupos de estudo ao redor do mundo com o objetivo de elucidar sua etiopatogenia. Durante muito tempo acreditou-se que a doença ocorria por isquemia do tecido laminar, no entanto, os estudos mais recentes apontam mecanismos diferentes e complexos. Diversas terapias sugeridas para o tratamento da afecção não apresentam resultados satisfatórios, em virtude de não agirem no mecanismo de desenvolvimento da afecção.

A laminite ocorre secundária a enfermidades que tenham envolvimento sistêmico, como a síndrome cólica, afecções respiratórias e reprodutivas (PARSONS *et al.*, 2007, LASKOSKI *et al.*, 2009); e também associada a alterações metabólicas, como na síndrome de Cushing, obesidade e após longos tratamentos com corticoides (EADES *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2002a), ou aplicação de força excessiva em membro contralateral devido a fratura (VAN EPS *et al.*, 2010).

Esta revisão tem o objetivo de compilar informações acerca da fisiopatogenia da laminite, bem como discutir os tratamentos realizados com base nos achados de pesquisa.

## 2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE LAMINITE

O estudo da laminite inflamatória, que ocorre secundária a doenças inflamatórias, tem sido realizado por meio da indução experimental via administração de carboidratos (amido de milho e oligofrutose) e extrato de noqueira preta (WEISS *et al.*, 1997; FAGLIARI *et al.*, 1998; FALEIROS *et al.*, 2009a; LIMA *et al.*, 2013). A laminite endocrinopática, que ocorre em cavalos com síndrome metabólica, pode ser induzida pela administração de insulina (DE LAAT *et al.*, 2010). Belknap *et al.* (2011) induziram laminite endocrinopática em pôneis pela administração de dieta rica em carboidratos durante sete dias. As lesões resultantes da afecção podal foram observadas após submeter cavalos normais à obstrução/isquemia gastrintestinal, simulando a laminite secundária a síndrome cólica (RIO TINTO *et al.*, 2004; LASKOSKI *et al.*, 2010). A avaliação do tecido laminar do casco de cavalos com síndrome cólica letal, de origem

natural, demonstrou alterações graves mesmo em animais sem presença anterior de sinais clínicos da afecção (LASKOSKI *et al.*, 2009), e o mesmo foi observado em cavalos com disfunção da pars intermedia da pituitária (LASKOSKI *et al.*, 2015).

Nem todos os cavalos submetidos à indução de laminite pelos modelos experimentais desenvolvem a doença. Na dose de 5g/kg de oligofrutose, somente 50% dos cavalos demonstram sinais clínicos de laminite (TOTH *et al.*, 2009), enquanto em doses maiores, a porcentagem de animais que demonstram laminite clínica pode chegar até 100% (VAN EPS; POLLITT, 2006; BAILEY *et al.*, 2009).

Existem diferenças entre os modelos experimentais, mesmo aqueles que induzem a laminite inflamatória. A sobrecarga por carboidratos é o modelo que mais se aproxima da laminite inflamatória natural, por possuir uma fase bem documentada de endotoxemia e sinais clínicos de sepse na fase prodrômica da doença, além de deflagrar alterações histopatológicas intensas no tecido laminar (GARNER *et al.*, 1975; LEISE *et al.*, 2011). Entretanto, o aumento dos mediadores inflamatórios laminares e a infiltração leucocitária ocorrem somente no início da claudicação, e não na fase de desenvolvimento (FALEIROS *et al.*, 2011), diferentemente do observado no modelo por extrato de noqueira preta, o qual causa aumento de mediadores inflamatórios teciduais uma hora e 30 minutos após a administração da substância, e também de infiltração leucocitária e expressão de citocinas laminares (LOFTUS *et al.*, 2007; FALEIROS *et al.*, 2009b). Estes surgem 8-10 horas após a administração do extrato de noqueira preta, diferente da sobrecarga por carboidratos, que ocorre entre 12 a 24 horas (GARNER *et al.*, 1975; NOURIAN *et al.*, 2007), contudo não leva ao desenvolvimento de alterações graves no tecido laminar (HURLEY *et al.*, 2006; BELKNAP *et al.*, 2007; LOFTUS *et al.*, 2007; NOURIAN *et al.*, 2007; BAILEY *et al.*, 2009; LEISE *et al.*, 2011). A administração de oligofrutose leva a um pico de endotoxinas plasmáticas após 8 horas, e aumento do TNF- $\alpha$  entre 12 a 24 horas, observando-se que esta citocina aumenta apenas neste modelo (BAILEY *et al.*, 2009).

### 2.3 ACHADOS ANATOMO-PATOLÓGICOS

A anatomopatologia do casco afetado pela laminite é avaliada com base nas alterações características da laminite. Macroscopicamente, são visualizadas pela deformação do casco, rotação e/ou afundamento da falange distal na fase crônica, e microscopicamente, pelas mudanças morfológicas do tecido laminar, que iniciam já na fase prodrômica (POLLITT, 1996; LASKOSKI *et al.*, 2009). O tecido laminar do casco constitui-se de interdigitações formadas pelo tecido dérmico e epidérmico, os quais possuem lâminas primárias e secundárias (Figura 1), unidas pela membrana basal. O tecido epidérmico possui células basais que se conectam a membrana basal por hemidesmossomos (POLLITT, 1996). A classificação das alterações do tecido laminar considera, principalmente, as alterações presentes nos núcleos das células basais (CB), o formato das lâminas epidérmicas secundárias (LES), demonstrados, e o contorno da membrana basal (MB).



Figura 1. Fotomicrografia do tecido laminar de equino hígido, demonstrando as interdigitações entre lâminas epidérmicas e dérmicas. Observa-se lâminas epidérmicas secundárias (LES) arredondadas e adequadamente interdigitadas com o tecido dérmico e núcleos das células basais (setas) alongados. LEP: lâmina epidérmica primária; LDP: lâmina dérmica primária

Croser e Pollitt (2006) demonstraram, por meio de biópsia seriada do tecido laminar em cavalos com laminite induzida por carboidratos, que os eventos morfológicos iniciais são o arredondamento do núcleo das CB e afilamento da extremidade das LES, com redução do espaço ocupado pelas lâminas dérmicas secundárias (LDS), e também a degradação da MB. Segundo Leise *et al.*, (2014), a alteração das células basais é um dos eventos primários no desenvolvimento da laminite, culminando de maneira efetiva para a desestruturação laminar. Os casos mais graves de injúria laminar demonstram destruição das interdigitações, com consequente enfraquecimento do tecido, o qual torna-se incapaz de manter a união entre a falange distal e a muralha do casco (POLLITT, 1996; LASKOSKI *et al.*, 2010).

Os achados dos estudos acerca da laminite endocrinopática demonstraram que existem diferenças histopatológicas entre a doença inflamatória e endócrina. de Laat *et al.* (2010) induziram laminite clínica pela administração de insulina, e observaram aumento da proliferação tecidual, com alongamento e afilamentos das lâminas epidérmicas secundárias, arredondamento do núcleo das células basais e contorno indefinidos e ausente da membrana basal apenas em alguns segmentos, sem grande perda da estrutura laminar, como observado por Pollitt (1996) na laminite inflamatória. Neste modelo, o alongamento e estreitamento das LES parecem ser as alterações iniciais, como observado por Karikoski *et al.* (2014). Laskoski *et al.* (2015b) verificaram alterações semelhantes em cavalos com disfunção da pars intermedia da Pituitária, sem sinais clínicos de laminite. Nourian *et al.* (2007) também observaram alterações mais sutis em pôneis com laminite após hiperinsulinemia induzida, sugerindo um remodelamento do tecido laminar típico da laminite crônica descrita por Johnson *et al.* (2004), especialmente porque a laminite endocrinopática na maioria das vezes é diagnosticada na fase crônica (DONALDSON *et al.*, 2004).

## 2.4 ACHADOS CLÍNICOS

A laminite causa intensa claudicação, desconforto e dificuldade de permanecer em posição quadrupedal. No entanto, a apresentação dos sinais clínicos muitas vezes difere dependendo da fase em que a doença se encontra.

As fases da laminite são prodrômica, aguda, subaguda e crônica. Na fase prodrômica, ocorre o desenvolvimento das alterações do tecido laminar do casco, e esta fase pode não ser notada por apresentar sinais sutis, como aumento do pulso digital e alterações associadas à sepse, como mucosas avermelhadas, taquicardia, aumento do tempo de preenchimento capilar, anorexia, hipertermia e redução da motilidade intestinal (POLLITT, 1999; PARSONS *et al.*, 2007), mais facilmente notados se o animal estiver sob tratamento para outra afecção inflamatória, como síndrome cólica.

Na fase aguda o pulso digital continua aumentado, e há elevação da temperatura do casco e início da claudicação, e a intensidade da dor é avaliada pelos graus de OBEL, os quais variam de 1 a 4:

Grau 1: o eqüino levanta os membros torácicos incessantemente, alternando o apoio no solo em intervalos de poucos segundos. A claudicação é pouco pronunciada e o animal retira rapidamente o membro do solo.

Grau 2: o eqüino movimenta-se voluntariamente ao passo, encurtando ainda mais a fase de apoio ao solo. Ainda é possível erguer-se um dos membros torácicos do animal sem muita dificuldade.

Grau 3: o eqüino reluta em locomover-se e reage, não permitindo qualquer tentativa de erguer um de seus membros torácicos

Grau 4: o eqüino somente inicia a locomoção se for forçado, e ao fazê-lo, projeta simultaneamente os dois membros torácicos para cima e para frente. Acima desse grau, dificilmente o animal conseguirá manter-se em posição quadrupedal passando a maior parte do tempo em decúbito (OBEL, 1948).

Na fase aguda pode ocorrer a estabilização do quadro sem rotação e/ou afundamento da falange distal, e o cavalo entra na fase subaguda até a recuperação completa, ou pode ocorrer a progressão da doença para a fase crônica (HOOD, 1999).

Na fase crônica ocorre a rotação e/ou afundamento da falange distal, e este processo pode gerar alterações estruturais como deformação do casco, perfuração da sola, formação de anéis na muralha, alongamento da pinça e talão, podendo ocorrer até mesmo a perda do estojo córneo (MORRISON, 2010).

No diagnóstico radiográfico observa-se ausência do paralelismo entre a falange distal e a muralha do casco quando há rotação, e/ou aumento da distância entre a borda coronária e o processo extensor da falange distal, no afundamento (HOOD, 1999; MORRISON, 2010). A severidade das alterações radiográficas está comumente associada à intensidade da dor manifestada pelo animal, com exceção dos casos de laminite endocrinopática, cujos sinais clínicos podem ser sutis ou até mesmo imperceptíveis (JOHNSON, 2002b). Alterações ósseas são comumente observadas na falange distal de cavalos com laminite crônica, como osteólise e inflamação medular, e estas lesões degenerativas podem ser observadas até mesmo na fase inicial da laminite aguda (ENGILES *et al.*, 2015).



## 2.5 FISIOPATOGENIA

A laminite ocorre pela perda da união entre as lâminas dérmicas e epidérmicas do tecido laminar, as quais constituem interdigitações muito fortes responsáveis pela adesão da falange distal à muralha do casco (POLLITT, 1996). Uma vez que ocorra a perda da integridade laminar, a força resultante do peso do animal sobre o casco e a tração exercida pelo tendão do músculo flexor digital profundo levam à rotação e/ou afundamento da falange distal (POLLITT, 1994).

Estudos experimentais têm indicado correlação de vários mecanismos envolvidos na patogênese da doença. Os principais mecanismos são isquêmico, enzimático, endócrino (metabólico) e inflamatório (POLLITT, 1996; RIO TINTO *et al.*, 2004; KARIKOSKI *et al.*, 2014). O estresse oxidativo e a apoptose também são pesquisados como causadores da falência do tecido laminar do casco. Traumas graves, como fraturas em membros que impeçam o suporte de peso no membro acometido, frequentemente estão associados ao desenvolvimento de laminite no membro contralateral, possivelmente pela redução da perfusão no tecido laminar do casco causado pelo peso excessivo (BAXTER; MORRISON, 2008). No entanto, poucos estudos são realizados sobre a laminite que ocorre nestas situações.

### 2.5.1 Mecanismos Isquêmicos

A teoria vascular postula que as lesões laminares são causadas por vasoconstrição digital, abertura de anastomoses arteriovenosas ou formação de microtrombos venosos, levando a estase sanguínea e, consequentemente, edema tecidual e necrose (PERONI *et al.*, 2005; NOSCHKA *et al.*, 2009a). Diversos experimentos buscaram comprovar esta hipótese, sendo que os resultados mais importantes foram obtidos *in vitro* (ALLEN *et al.*, 1990; KEEN *et al.*, 2008). Evidências do envolvimento inflamatório sistêmico demonstram que os mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, podem agir causando vasoconstrição digital (NOSCHKA *et al.*, 2009a). A contratilidade vascular é superior em veias do que em artérias laminares quando estas são sensibilizadas com vasoconstritores agonistas, e esta resposta é o oposto da encontrada nos

vasos digitais, em que as artérias sofrem maior contratilidade que as veias (PERONI *et al.*, 2005). Keen *et al.* (2012) observaram que o cortisol e a insulina possuem efeito na reatividade dos vasos laminares a agentes vasoativos, buscando associar a laminite endócrina à teoria isquêmica. Pawlak *et al.* (2014) demonstraram que o tecido laminar do casco reside em ambiente profundamente hipoxêmico em condições normais quando comparado a outros órgãos, e por isso pode ser o primeiro a sofrer lesão em decorrência da inflamação sistêmica em pacientes septicêmicos.

A patogenia da laminite pode estar relacionada à agregação e adesão plaquetária sobre o endotélio íntegro, evento frequente nos quadros de abdômen agudo (DIVERS, 2003), resultando em redução ou até mesmo ausência do fluxo sanguíneo para o tecido anteriormente irrigado. Weiss *et al.* (1995) observaram a formação de microtrombos na parede de vasos localizados na lâmina dérmica. Semelhante ao que ocorre na síndrome metabólica no homem, que é caracterizada por eventos inflamatórios e pró-trombóticos (ODROWAZ-SYPNIEWSKA, 2007), seria possível que o mesmo mecanismo pudesse ocorrer nos equinos, predispondo à doença por afluxo sanguíneo insuficiente (ROBERTSON *et al.*, 2009). Contudo, Prasse *et al.* (1990) demonstraram que alterações de coagulação e fibrinólise não são primordiais para o desenvolvimento da laminite. Martins Filho *et al.* (2008) e Weiss *et al.* (1994) observaram a presença de microtrombos em vasos laminares, entretanto estes achados não estão presentes na maioria das pesquisas avaliando a histopatologia do tecido laminar de cavalos com laminite induzida experimentalmente.

Weiss *et al.* (1995) notaram redução do suprimento sanguíneo no casco de cavalos com laminite induzida experimentalmente depois que a lesão havia sido instalada, e sabe-se que a diminuição do aporte circulatório foi comprovada na fase crônica da doença (BALDWIN; POLLITT, 2010).

Achados experimentais como a ausência da xantina oxidase, enzima liberada durante a isquemia tecidual, contestam a vasoconstrição como evento principal para o aparecimento da laminite (LOFTUS *et al.*, 2007). Existem evidências de vasodilatação presente no início de desenvolvimento da doença, a qual está associada ao aumento da temperatura e do fluxo sanguíneo no tecido laminar (POLLITT; DAVIES, 1998; POLLITT, 1999; POLLITT, 2003). Pollitt e

Davies (1998) sugerem que, após a sobrecarga de carboidratos, ocorra um período de 12 a 40 horas de vasodilatação, precedendo os sinais clínicos da laminite. A teoria isquêmica como evento principal enfraqueceu após os resultados de Van Eps e Pollitt (2004), os quais preveniram/amenizaram as lesões laminares em membros colocados no gelo durante a indução da laminite em cavalos.

### 2.5.2 Mecanismos Enzimáticos

Segundo a teoria enzimática, a laminite ocorre pela degradação do colágeno presente na MB por enzimas ativadas no casco ou vindas da circulação sanguínea (POLLITT, 1996). As enzimas mais implicadas neste processo são as metaloproteinases (MMP) 2 e 9, collagenases presentes no tecido laminar para adaptação ao crescimento da muralha do casco (POLLITT, 1996; POLLITT; DARADKA, 1998). A ativação destas enzimas ainda é pouco conhecida, sugerindo-se o envolvimento de toxinas bacterianas, absorvidas do trato gastrointestinal, e de citocinas inflamatórias deflagradas nos quadros de ativação inflamatória sistêmica, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (POLLITT, 1999). Dentre as toxinas bacterianas que ativam as MMPs, as exotoxinas de espécies de *Streptococcus*, especialmente *Streptococcus bovis* assumem grande importância (POLLITT, 1999; MILINOVICH *et al.*, 2007). A concentração de metaloproteinases aumenta de maneira considerável 48 horas após a indução de laminite por administração de carboidratos (KYAW-TANNER; POLLITT, 2004), e encontra-se superior em cavalos com laminite natural (JOHNSON *et al.* 1998). A administração de insulina causa aumento somente da MMP-9 inativa (DE LAAT *et al.*, 2011).

Laskoski *et al.* (2013) observaram aumento significativo da MMP-2 no tecido de cavalos submetidos a obstrução intestinal experimental, no entanto, sugeriram que este achado seria consequência do remodelamento tecidual secundário à alteração morfológica do tecido laminar, e não a causa da enfermidade. Visser e Pollitt (2012) observaram que as MMPs aparentemente não estão relacionadas com o início da lesão laminar induzida por oligofrutose.

### 2.5.3 Mecanismos Endócrinos ou Metabólicos

A teoria metabólica explica o desenvolvimento da laminite nos quadros endócrinos, como nos cavalos acometidos pela disfunção da pars intermedia da pituitária (PPID), animais obesos ou que receberam altas concentrações e por período prolongado de glicocorticoides (DONALDSON *et al.*, 2004; RYU *et al.*, 2004; MCFARLANE, 2007; DE LAAT *et al.*, 2010). Os animais com alterações endócrinas apresentam glicemia e insulina elevadas, e em praticamente todos os casos com alterações podais verifica-se resistência à insulina (DE LAAT *et al.* 2010).

A PPID, conhecida como síndrome de Cushing, é melhor denominada por disfunção da pars intermédia da pituitária, pois ocorre devido a dano oxidativo dos neurônios dopaminérgicos, os quais deixam de inibir a produção de melanocortinas pela pars intermédia, e esta hipertrofia-se em decorrência da elevada produção (MCFARLANE, 2007). A doença ocorre normalmente em cavalos com mais de 15 anos de idade, e evidencia sinais clínicos como aumento de pelos pelo corpo, acúmulo de tecido adiposo (em especial na fossa supra orbitária), poliúria, polidipsia e laminite (JOHNSON *et al.*, 2002a). Animais obesos, particularmente pôneis, apresentam alta incidência de laminite por apresentarem frequentemente síndrome metabólica, com resistência à insulina (MORGAN *et al.*, 2015). Pode-se identificar um animal obeso pelo escore corporal acima de 3, com presença de gordura na fossa supra-orbitária, na base da cauda e especialmente pelo depósito na curvatura dorsal do pescoço, denominado de “cresty neck” (BECVAROVA; PLEASANT, 2012). O tratamento prolongado com glicocorticoide pode causar a laminite (RYU *et al.*, 2004), pelo aumento da resistência à insulina, mais observado após a administração de dexametasona (TILEY *et al.*, 2007) do que de prednisolona (JORDAN *et al.*, 2015).

Pôneis são os animais mais acometidos pela laminite endócrina, e são utilizados para indução da afecção por ingestão de carboidratos (BELKNAP *et al.*, 2011). Existem diferenças entre raças equinas, observando-se que pôneis e cavalos da raça Andaluz possuem maior predisposição quando comparados à cavalos Puro Sangue (BAMFORD *et al.*, 2014). A obesidade causa aumento de citocinas inflamatórias, provavelmente pela produção destas por adipócitos

(HUTLEY; PRINS, 2005; VICK *et al.*, 2007). Há correlação positiva entre a obesidade e achados radiográficos de laminite nas raças Crioula e Mangalarga (PAZ *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2014).

A hiperglicemia e resistência à insulina parecem estar implicadas no desenvolvimento de um status inflamatório, deflagrando inflamação sistêmica subaguda crônica (SHOELSON *et al.*, 2006; GEOR; FRANK, 2009), o que tornaria os animais com estas alterações menos tolerantes aos efeitos deletérios da resposta inflamatória que ocorre na sepse (VAN EPS; POLLITT, 2006; EADES *et al.*, 2007), semelhante ao observado no homem (SINGER; GRANGER, 2007). Tadros *et al.* (2013) notaram expressão prolongada de citocinas por leucócitos circulantes em cavalos com síndrome metabólica, que foram estimulados com lipopolissacarídeos (LPS). Os resultados de Belknap *et al.* (2011) demonstram que a laminite endocrinopática desenvolvida em pôneis alimentados com dieta de elevado nível de carboidratos por sete dias, não relaciona-se a eventos inflamatórios por não despertar aumento de quimiocinas inflamatórias quando comparada a modelos de indução de laminite por administração de carboidratos e extrato de noqueira preta. No entanto, os achados observados por Wray *et al.* (2013) demonstram que pode haver o envolvimento da inflamação na laminite endocrinopática, pois pôneis com laminite expressam concentrações inferiores de adiponectina, a qual é um hormônio anti-inflamatório, o que sugere que estes animais possuam uma menor capacidade anti-inflamatória.

#### 2.5.4 Mecanismos Inflamatórios

Uma série de eventos inflamatórios ocorrem na fase prodrômica da laminite, como elevação dos mediadores inflamatórios, em especial o TNF- $\alpha$ , (LOFTUS *et al.*, 2007; NOSCHKA *et al.*, 2009b), espécies reativas de oxigênio (HURLEY *et al.*, 2006) e infiltração leucocitária tecidual (BLACK *et al.*, 2006; HURLEY *et al.*, 2006; FALEIROS *et al.*, 2009a).

A ativação inflamatória sistêmica, observada na laminite inflamatória, pode ser de origem infecciosa, como a exposição a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou devido a liberação endógena de padrões

moleculares associados ao dano (DAMPs) que ocorrem em injúria tecidual como, por exemplo, em alças intestinais comprometidas na síndrome cólica. A endotoxina, o PAMP mais comum, está associada ao desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica que ocorre em diversas afecções, detectada no sangue de cavalos submetidos a laminite experimental por sobrecarga de carboidratos (BAILEY *et al.*, 2009). A circulação de endotoxinas ocorre neste modelo provavelmente porque há redução do pH cecal com elevação da concentração das endotoxinas, as quais ganham a circulação sistêmica pelo aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (VAN EPS; POLLITT, 2006; POLLITT; VISSER, 2010). Os órgãos liberam mediadores inflamatórios durante a sepse, especialmente fígado e pulmão (CAVAILLON; ANNANE, 2006), e assim, talvez o aumento destes mediadores na fase prodrômica da laminite possa ser um achado de co-morbidade, uma vez que Tadros *et al.* (2012) não constataram diferença na concentração destes mediadores entre cavalos que desenvolveram ou não a laminite.

Faleiros *et al.* (2011a e 2009b) demonstraram que ocorre aumento de quimiocinas laminares relacionados à indução por sobrecarga de carboidratos. A infiltração leucocitária ocorre logo uma hora e 30 minutos após a indução da laminite com extrato de noqueira preta (FALEIROS *et al.*, 2009a), diferente do modelo de indução com carboidratos, que ocorre somente no início dos sinais clínicos da afecção (FALEIROS *et al.*, 2011b; VISSER; POLLITT, 2011). Visser e Pollitt (2011) sugerem, inclusive, que este aumento ocorre posteriormente à degradação da membrana basal. Existe um aumento de leucócitos laminares na fase de desenvolvimento da laminite em cavalos após obstrução jejunal experimental (LASKOSKI *et al.*, 2012).

A administração de endotoxinas não leva ao desenvolvimento de laminite em cavalos (TOTH *et al.*, 2009; TADROS; FRANK, 2012). Toth *et al.* (2009) observaram que a administração de LPS aumentou a resposta inflamatória decorrente da indução de laminite por oligofrutose; no entanto, não houve agravamento das lesões laminares (TADROS *et al.*, 2012). Modelos de endotoxemia, utilizados na medicina humana, induzem punções intestinais e/ou ligaduras em ceco, em animais de laboratório. A injúria tecidual causada estimula a resposta inflamatória tanto por PAMPs quanto por DAMPs, porque a administração de porções isolados de bactérias gram negativas, como os

lipopolissacarídeos (LPS), não despertam resposta inflamatória com a mesma intensidade (LIAUDET *et al.*, 2003; BURAS *et al.*, 2005). O desenvolvimento de laminite secundária à síndrome cólica provavelmente está mais associado a este modelo experimental.

Há indícios de que a laminite ocorra secundária a resposta inflamatória sistêmica e desenvolvendo-se como injúria à distância (FALEIROS *et al.*, 2008), o que permite associar a doença com a falência de múltiplos órgãos observada no homem (BELKNAP *et al.*, 2009). Rio Tinto *et al.* (2004) e Laskoski *et al.* (2010) observaram alterações no tecido laminar do casco de cavalos após obstrução intestinal, provavelmente devido a ativação inflamatória sistêmica deflagrada pela injúria de isquemia-reperfusão que pode ocorrer em doenças gastrintestinais.

#### 2.5.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo está associado à patogênese de muitas doenças, causando injúria celular pela reação de radicais livres com proteínas celulares, lipídeos e ADN (BERG *et al.*, 2004). Este processo ocorre na síndrome da resposta inflamatória sistêmica, especialmente quando existe um aumento na quantidade de oxidantes superior à quantidade de agentes antioxidantes (MACDONALD *et al.*, 2003). O peroxinitrito induz citotoxicidade pela oxidação de triptofano e cisteína, nitração da tirosina, formação de ditirosina e fragmentação proteica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995).

O estresse oxidativo tem sido pesquisado como responsável pela injúria laminar em equinos. Yin *et al.* (2009) demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre durante as fases prodrômica e agudas da laminite induzida por extrato de noqueira preta. Burns *et al.* (2011) não encontraram evidências de peroxidação lipídica com 4-hidroxinonenal (4 HNE) na laminite induzida por carboidrato, e não observaram aumento de nitrotirosina, que é o marcador tecidual de peroxinitritos, após a administração de carboidrato e extrato de noqueira preta.

O estresse oxidativo também tem sido pesquisado na laminite endocrinopática. de Laat *et al.* (2012) observaram produtos finais de glicação avançada (AGEs) em cavalos com laminite induzida pela insulina. Estas

substâncias, quando ligadas a seus receptores, causam a liberação de mediadores inflamatórios e induzem o estresse oxidativo. Treiber *et al.* (2009) não notaram diferenças entre as concentrações de nitrotirosina e superóxido dismutase circulantes entre pôneis com laminite associada ao pasto e animais saudáveis. O tecido muscular, em cavalos obesos com resistência à insulina, não contribui para a síndrome metabólica por estresse oxidativo, por elevar a quantidade tecidual de antioxidantes (BANSE *et al.*, 2015), não acentuando a injúria local pela neutralização dos agentes oxidantes.

#### 2.5.6 Apoptose

O tecido laminar, na fase de desenvolvimento da laminite, não exhibe a presença de edema e necrose, e como a apoptose é uma forma de morte celular que não desencadeia reação inflamatória local, seu aumento no tecido laminar de animais com sinais clínicos da doença, explicaria a falência das células basais que ocorre nesta fase.

A apoptose está presente no tecido laminar de cavalos normais, provavelmente promovendo a renovação celular. Faleiros *et al.* (2004) relataram aumento da taxa de apoptose em cavalos com laminite naturalmente adquirida com até uma semana de evolução, quando comparados a animais no período prodrômico ou com laminite crônica. Em seres humanos, a apoptose relaciona-se com lesões de isquemia, sendo detectada mais frequentemente durante o período de reperfusão (OLIVETTI *et al.*, 1997). Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio e as MMPs, estimuladas pela injúria de isquemia e reperfusão, possam ativar a cascata de apoptose (CHEUNG *et al.*, 2000). No entanto, Laskoski *et al.* (2010) não observaram aumento de células apoptóticas no tecido laminar de cavalos após 18 horas de reperfusão intestinal, os quais demonstraram lesões laminares sem sinais clínicos de laminite. Desta forma, a ocorrência da apoptose pode estar associada à gravidade das lesões encontradas na laminite, após a fase prodrômica da afecção, quando já houve manifestação clínica.



## 2.6 TRATAMENTO

Existem diversos tratamentos disponíveis para a laminite. As principais medidas serão apresentadas, de acordo com os resultados encontrados em pesquisas científicas.

O tratamento da laminite deve ser empregado conforme a fase clínica da doença. A evidência de inflamação laminar durante a fase prodrômica da laminite sugere que drogas anti-inflamatórias possam ser úteis. Laskoski *et al.* (2012) verificaram que a administração de hidrocortisona reduz a lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL), indicando menor infiltração leucocitária laminar em cavalos submetidos a isquemia-reperfusão experimental. Lima *et al.* (2013) constataram que a administração de antagonistas de quimiocinas não reduzem o desconforto doloroso em cavalos com laminite induzida, mas reduzem as citocinas circulantes.

A respeito da utilização da heparina, existem resultados controversos. Martins Filho *et al.* (2008) não encontraram redução na intensidade da injúria laminar após a administração de heparina no início da claudicação em cavalos com laminite induzida por carboidrato. Entretanto, a substância previne a laminite em cavalos com duodeno jejunité proximal (DE LA REBIERE *et al.*, 2008). Paralelamente ao efeito anti-trombótico da heparina, sugere-se que a substância produza efeitos anti-inflamatórios, como a redução de mieloperoxidase (DE LA REBIERE *et al.*, 2008).

O tratamento preventivo mais efetivo realizado na fase prodrômica é a crioterapia, imergindo os membros do cavalo no gelo enquanto se observarem sinais clínicos de resposta inflamatória sistêmica, como coloração de membranas mucosas avermelhadas, aumento do tempo de preenchimento capilar, taquicardia e depressão (VAN EPS; POLLITT, 2004). A crioterapia é mais efetiva na fase prodrômica da laminite, por outro lado, Van Eps *et al.* (2014) têm demonstrado redução na gravidade da laminite aguda. O estudo de Kullmann *et al.* (2013) demonstrou que a utilização da crioterapia preventiva em cavalos com colite reduziu a incidência de laminite clínica que comumente ocorre nestes casos.

A restrição da movimentação do cavalo na laminite aguda e a utilização de botas macias são importantes para reduzir a concussão do casco no solo, o

que agrava ainda mais a injúria laminar (MORRISON, 2010). A acepromazina pode ser utilizada para restringir movimento por causar leve sedação, e por apresentar efeito vasodilatador (INGLE-FEHR; BAXTER, 1999), apesar de controverso nesta fase.

Em casos de laminite secundária a anormalidades metabólicas, pode-se utilizar a metformina, a qual aumenta a sensibilidade das células à insulina. A medicação evidenciou uma melhora clínica de 78% em pôneis e cavalos com resistência à insulina (DURHAM *et al.*, 2008).

A analgesia é realizada normalmente pela administração de drogas não esteroidais, mas em casos graves pode-se utilizar opióides como o tramadol, especialmente na fase crônica (GUEDES *et al.*, 2015). No que se refere a melhoria da circulação sanguínea do tecido laminar, o qual evidencia grandes áreas de necrose na fase crônica, Ingle-Fehr e Baxter (1999) observaram que a acepromazina aumenta o fluxo sanguíneo digital.

O tratamento corretivo do casco, na fase crônica da laminite, tem uma vasta literatura. As principais medidas utilizadas nesta fase são casqueamento e aplicação de ferraduras, sendo que existem diversas técnicas, algumas de efetividade questionável, mas especialmente pela resposta individual e diferentes graus de comprometimento do casco (PARKS; O'GRADY, 2003; MORRISON, 2010). Os objetivos destas práticas são de estabilizar a falange, reduzir a dor e estimular novo crescimento do casco. O realinhamento da falange distal e sola devem ser realizados pela remoção do talão e muralha do casco, progressivamente. A aplicação de ferraduras em forma de coração (heart bar shoe), oval ou invertida tem sido indicada. Entretanto, materiais alternativos têm sido muito utilizados, como a fixação de tamanco de madeira para aumentar o suporte da rasilha, e reduzir a superfície de contato com o solo, melhorando o "breakover", ou seja, reduzindo a força necessária para que o casco deixe o solo durante a movimentação (STEWART, 2010). Algumas estratégias são utilizadas para minimizar o descolamento mecânico e, conseqüentemente, a injúria laminar. A aplicação de substâncias fixantes na sola do casco, como a resina acrílica ou epóxi, em associação com ferraduras (MORRISON, 2010) são úteis para controlar a progressão da doença. Em alguns casos, a tenotomia é recomendada, removendo a pressão exercida pelo tendão sobre a falange distal (HUNT *et al.*, 1990). A ressecção da muralha do casco, na laminite aguda ou

crônica, permite a drenagem de líquidos, os quais contribuiriam para o agravamento da injúria, pelo aumento da pressão dentro do casco. Em certos casos, quando o crescimento irregular da parede do casco é observada devido a necrose e comprometimento da borda coronária, a remoção da muralha pode facilitar o crescimento e realinhamento à falange distal (RUCKER, 2010).

Van Eps e Pollitt (2009) demonstraram que o tecido laminar do casco tem elevada capacidade de reorganização após episódios de laminite aguda. Entretanto, em alguns casos o animal não apresenta resposta positiva ao tratamento, e a condição se agrava a tal ponto em que a eutanásia passa a ser a única medida para aliviar o sofrimento do animal.

## 2.7 CONCLUSÃO

Pesquisas focadas no tratamento da laminite são infrutíferas sem o entendimento de sua fisiopatogenia. Com o progresso do conhecimento alcançado atualmente, permitindo novas perspectivas de investigações, acredita-se que o mecanismo de desenvolvimento de laminite será um dia conhecido e, portanto, terapias mais precisas e eficazes poderão ser encontradas para reduzir a gravidade dessa condição.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, D. J.; CLARK, E. S.; MOORE, J. N.; PRASSE, K. W. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 1930-1934, 1990.

BAILEY, S.R.; ADAIR, H.S.; REINEMEYER, C.R.; MORGAN, S.J.; BROOKS, A.C.; LONGHOFER, S.L.; ELLIOTT, J. Plasma concentration of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, n.3-4, p.167-173, 2009.

BALDWIN, G.I.; POLLITT, C.C. Progression of venographic changes after experimentally induced laminitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.26, n.1, p.135-140, 2010.

BAMFORD, N.J.; POTTER, S.J.; HARRIS, P.A.; BAILEY, S.R. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and

ponies of moderate body condition score. **Domestic Animal Endocrinology**, v.47, p. 101-107, 2014.

BANSE, H.E.; FRANK, N.; KWONG, G.P.; MCFARLANE, D. Relationship of oxidative stress in skeletal muscle with obesity and obesity-associated hyperinsulinemia in horses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.79, n.4, p.329-338, 2015.

BAXTER, G.M.; MORRISON, S. Complications of unilateral weight bearing. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.24, n.3, p.621-642, 2008.

BECVAROVA I.; PLEASANT R.S. Managing obesity in pasture-based horses. **Compendium on Continuing Education for Veterinarians**, v.34, n.4, p.1-4, 2012.

BELKNAP, J.K.; GIGUERE, S.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A.M.; VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal**, v.39, p.42-7, 2007.

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.155-157, 2009.

BELKNAP, J.K.; FALEIROS, R.R.; BLACK, S.J.; JOHNSON, P.J.; EADES, S. The laminar leukocyte: from sepsis to endocrinopathy models of laminitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.31, p.562-609, 2011.

BERG, K.; WISETH, R.; BJERVE, K.; BRUROK, H.; GUNNES, S.; SKARRA, S.; JYNGE, P.; BASU, S. Oxidative stress and myocardial damage during elective percutaneous coronary interventions and coronary angiography. A comparison of blood-borne isoprostane and troponin release. **Free Radical Research**, v. 38, p. 517-525, 2004.

BLACK, S. J.; LUNN, D. P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S. D.; BELKNAP, J. K. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 161-166, 2006.

BURAS, J.A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Review Drug Discovery**, v.4, p.854-65, 2005.

BURNS, T.A.; WESTERMAN, T.; NUOVO, G.J.; WATTS, M.R.; PETTIGREW, A.; YIN, C.; BELKNAP, J.K. Role of Oxidative Tissue Injury in the Pathophysiology of Experimentally Induced Equine Laminitis: A Comparison of 2 Models. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 540-548, 2011.

CAVAILLON, J.M.; ANNANE, D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. **Journal of Endotoxin Research**, v.12, p.151-170, 2006.

CHEUNG, P. Y.; SAWICKI, G.; WOZNIAK, M.; WENJIE WANG; RADOMSKI, M. W.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. **Circulation**, v.101, p.1833-1839, 2000

CROSER, E. L.; POLLITT, C. C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. American Association of Equine Practitioners, Santo Antonio, dez. 2006. Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2006/croser/chapter.asp?LA=1>> Acesso em: 10 fev. 2016.

DE LAAT, M.A.; MCGOWAN, C.M.; SILLENCE, M.N.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinemia in Standard bred horses. **Equine Veterinary Journal**, v.42, p.129-135, 2010.

DE LAAT, M.A.; KYAW-TANNER, M.T.; NOURIAN, A.R.; MCGOWAN, C.M.; SILLENCE, M.N.; POLLITT, C.C. The developmental and acute phases of insulin-induced laminitis involve minimal metalloproteinase activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.140, n.3-4, p.275-284, 2011.

DE LAAT, M.A.; KYAW-TANNER, M.T.; SILLENCE, M.N.; MCGOWAN, C.M.; POLLITT, C.C. Advanced glycation end products in horses with insulin-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p.395-401, 2012

DE LA REBIERE, G.; FRANCK, T.; DEBY-DUPONT, G.; SALCICCIA, A.; GRULKE, S.; PÉTERS, F.; SERTEYN, D. Effects of unfractionated and fractionated heparins on myeloperoxidase activity and interactions with endothelial cells: possible effects on the pathophysiology of equine laminitis. **Veterinary Journal**, v.178, p.62-69, 2008.

DIVERS, T. J. Prevention and treatment of thrombosis, phlebitis, and laminitis in horses with gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v. 19, n. 3, p. 779-790, 2003.

DONALDSON, M.T.; JORGENSEN, A.J.; BEECH, J. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v.224, p.1123–1127, 2004.

DURHAM, A.E.; RENDLE, D.I.; NEWTON, J.E. The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and beta cell response in 18 horses and ponies with insulin resistance. **Equine Veterinary Journal**, v.40, p.493-500, 2008.

EADES, S. C.; HOLM, A. M. S.; MOORE, R. M. A review of the pathophysiology and treatment of acute laminitis: pathophysiologic and therapeutic implications of endothelin-1. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 48, p. 353-361, 2002.

EADES, S. C.; STOKES, A. M.; JOHNSON, P. J.; LEBLANC, C. J.; GANJAM, V. K.; BUFF, P. R.; MOORE, R. M. Serial alterations in digital hemodynamics and

endothelin-1 immunoreactivity, platelet-neutrophil aggregation, and concentrations of nitric oxide, insulin glucose obtained from horses following carbohydrate overload. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 87–94, 2007.

ENGILES, J.B.; GALANTINO-HOMER, H.L.; BOSTON, R.; McDONALD, D.; DISHOWOTZ, M.; HANKENSON, K.D. Osteopathology in the equine distal phalanx associated with the development and progression of laminitis. **Veterinary Pathology**, v.52, n.5, p.928-944, 2015.

FAGLIARI, J.J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O.A.; WEISS, D.J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.10, p.1234-1237, 1998.

FALEIROS, R.R.; STOKES, A.M.; EADES, S.C.; KIM, D.Y.; PAULSEN, D.B.; MOORE, R.M. Assessment of apoptosis in epidermal lamellar cells in clinically normal horses and those with laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, n.5, p.578-585, 2004.

FALEIROS R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.S.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; MOORE, R.M. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.72, p.68-72, 2008.

FALEIROS, R.R.; NUOVO, G.J.; BELKNAP, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.1, p.174-181, 2009a.

FALEIROS, R.R.; LEISE, B.B.; WESTERMAN, T.; YIN, C.; NUOVO, G.J.; BELKNAP, J.K. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.349, p.1-10, 2009b.

FALEIROS, R.R.; LEISE, B.S.; WATTS, M.; JOHNSON, P.J.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.15, n.1-2, p.45-51, 2011a.

FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J.; MESSER, N.T.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, p.107-115, 2011b.

GARNER, H. E.; COFFMAN, J. R.; HAHN, A. W.; HUTCHESON, D. P.; TUMBLESON, M. E. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 441-445, 1975.

GEOR, R.; FRANK, N. Metabolic syndrome—From human organ disease to laminar failure in equids. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, n.3-4, p.151-154, 2009

GUEDES, A.; KNYCH, H.; HOOD, D. Plasma concentrations, analgesic and physiological assessments in horses with chronic laminitis treated with two doses of oral tramadol. **Equine Veterinary Journal**, 2015, in press.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, p. 1-8, 1990.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.15, p.325-343, 1999.

HUNT, R.J.; ALLEN, D.; BAXTER, G.M.; JACKMAN, B.R.; PARKS, A.H. Mid-metacarpal deep digital flexor tenotomy in the management of refractory laminitis in horses. **Veterinary Surgery**, v.20, n.1, p.15-20, 1990.

HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J.; DONOVAN, D.C.; OKINAGA, T.; VANDENPLAS, M.L.; PERONI, J.F.; MOORE, J.N. Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, n.3-4, p.195-206, 2006.

HUTLEY, L.; PRINS, J. B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 330, p. 280–289, 2005

INGLE-FEHR, J.E.; BAXTER, G.M. The effect of oral isoxsuprine and pentoxifylline on digital and laminar blood flow in healthy horses. **Veterinary Surgery**, v.28, n.3, p.154-160, 1999.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letters**, v. 364, p. 279-282, 1995.

JOHNSON, P. J.; TYAGI, S. C.; KATWA, L. C.; GANJAM, V. K.; MOORE, L. A.; KREEGER, J. M.; MESSER, N. T. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **Veterinary Records**, v. 142, p. 392-396, 1998.

JOHNSON, P.J. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v.18, n.2, p.271-293, 2002a.

JOHNSON, P.J.; SLIGHT, S.H.; GANJAM, V.K.; KREEGER, J.M. Glucocorticoids and laminitis in the horse. **Veterinary Clinics of North American: Equine Practice**, v.18, n.2, p.219-236, 2002b.

JOHNSON, P.J.; MESSER, N.T.; SLIGHT, S.H.; WIEDMEYER, C.; BUFF, P.; GANJAM, V.K. Endocrinopathic laminitis in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.3, n.1, p.45-56, 2004.

JORDAN, V.; IRELAND, J.L.; RENDLE, D.I. Does oral prednisolone treatment increase the incidence of acute laminitis? **Equine Veterinary Journal**, 2015, in press

KARIKOSKI, N.P.; PATTERSON-KANE, J.C.; ASPLIN, K.E.; MCGOWAN, T.W.; MCNUTT, M.; SINGER, E.R.; MCGOWAN, C.M. Morphological and cellular changes in secondary epidermal of laminae horses with insulin-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.75, n.2, p.161-168, 2014.

KEEN, J. A.; HILLIER, C.; MCGORUM, B. C.; NALLY, J.E. Endothelin mediated contraction of equine laminar veins. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 50, p. 488-492, 2008.

KEEN, J. A.; MCGORUM, B. C.; HILLIER, C.; NALLY, J.E. Short-term incubation of equine laminar veins with cortisol and insulin alters contractility in vitro: possible implications for the pathogenesis of equine laminitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.36, p. 382-388, 2012.

KULLMANN, A.; HOLCOMBE, S.J.; HURCOMBE, S.D.; ROESSNER, H.A.; HAUPTMAN, J.G.; GEOR, R.J.; BELKNAP, J. Prophylactic digital cryotherapy is associated with decreased incidence of laminitis in horses diagnosed with colitis. **Equine Veterinary Journal**, v.46, n.5, p.554-559, 2013 .

KYAW-TANNER, M.; POLLITT, C. C. Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n.3, p. 221-225, 2004.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; PEREIRA, R.N.; URIBE DIAS, A.D.P.; ALESSI, A.C. Morphologic alterations of the hoof lamellar tissue, and clinic and laboratorial analyses of horses with lethal colic syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.731-735, 2009.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; SOUZA, A.H.; FALEIROS, R.R.; AMORIM, R.L. Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1331-1339, 2010.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; FALEIROS, R.R.; MENDES, H.M.F.; FERRUCCI, D.; SILVA, J.A.F.; STACH-MACHADO, D.D.R. Gelatinase associated lipocalin neutrophils (NGAL) and calprotectin in laminar tissue horses after jejunal obstruction, treated or not with hydrocortisone. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.9, p.817-823, 2012.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; FERRUCCI, D.; SILVA, J.A.F.; STACH MACHADO, D.R.; DORIA, R.G.S.; MENDONÇA, F.S.



Expression of matrix metalloproteases-2 and -9 in horse hoof laminae after intestinal obstruction, with or without hydrocortisone treatment. **Ciência Rural**, v.43, n.1, p.66-72, 2013.

LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.A.; CASTRO, M.L.; ARAUJO, F.F.; SILVA, J.R.; BASSO, F.Z.; DORNBUSCH, P.T.; DECONTO, I.; SOUSA, R.S. Histopathological hoof laminar changes in horses with Pituitary pars intermedia adenoma: cases report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.5, p.1226-1230, 2015.

LEISE, B.S.; FALEIROS, R.R.; WATTS, M.; JOHNSON, P.J.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.43, n.1, p.54-61, 2011.

LEISE, B.S.; WATTS, M.; ROY, S.; YILMAZ, S.; ALDER, H.; BELKNAP, J.K. Use of laser capture microdissection for the assessment of equine lamellar basal epithelial 1 cell signalling in the early stages of laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.4, p.478-488, 2014.

LIAUDET, L.; SZABO, C.; EVGENOV, O.V.; MURTHY, K.G.; PACHER, P.; VIRÁG, L.; MABLEY, J.G.; MARTON, A.; SORIANO, F.G.; KIROV, M.Y.; BJERTNAES, L.J.; SALZMAN, A.L. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. **Shock**, v.19, p.131-137, 2003.

LIMA, L.R.; MENDES, H.M.F.; MAGALHÃES, J.F.; MARKOWICZ, L.C.; CAVALCANTI, C.B.; PAES LEME, F.O.; TEIXEIRA, M.M.; FALEIROS, R.R. Clinical and hematologic equine laminitis subjected to a model oligofructose, treated or not with a receptor antagonist agent CXCR1/2. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.8, p.992-998, 2013.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A.; ABRAHAMSEN, E.J.; BELKNAP, J.K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.11, p.1205-1211, 2007.

MACDONALD, J.H.F.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, p. 221-232, 2003.

MAGALHÃES, J.F.; LIMA, L.R.; VARELA, J.A.R.C.; VIEIRA, R.A.M.; ALVEZ, G.E.S.; FALEIROS, R.R. Correlation of radiographic measurements indicator of laminitis in Mangalarga Marchador mares with and without overweight signals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.1123-1132, 2014.

MARTINS FILHO, L.P.; FAGLIARI, J.J.; MORAES, J.R.E.; SAMPAIO, R.C.; OLIVEIRA, J.A.; LACERDA NETO, J.C. Influence of heparin in occurrence of

equine laminitis induced carbohydrate overload. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1358-1366, 2008.

MCFARLANE, D.; DYBDAL, N.; DONALDSON, M.T.; MILLER, L.; CRIBB, A.E. Nitration and increased alpha-synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. **Journal of Neuroendocrinology**, v.17, p.73-80, 2007.

MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; BURRELL, P. C.; CROSER, E. L.; JASSIM, R.A.M.A.; MORTON, J.M.; VAN EPS, A.W.; POLLITT, C. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 2090-2100, 2007.

MORGAN, R.A.; KEEN, J.A.; McGOAN, C.M. Treatment of equine metabolic syndrome: a clinical case series. **Equine Veterinary Journal**, 2015, in press.

MORRISON, S. Chronic laminitis foot management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.26, n.2, p.425-446, 2010.

NOSCHKA, E.; MOORE, J.N.; PERONI, J.F.; LEWIS, S.J.; MORROW, J.D.; ROBERTSON, T.P. Thromboxane and isoprostanes as inflammatory and vasoactive mediators in black walnut heartwood extract induced equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, n.3-4, p.200-210, 2009a.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M. L.; HURLEY, D. J.; MOORE, J. N. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 129, 3-4, p. 242-253, 2009b.

NOURIAN, A. R.; BALDWIN, G. I.; VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, v.39, n. 4, p. 360-364, 2007.

OBEL, N. Studies of the histopathology of acute laminitis. **Veterinarians in Stockholm**, p.1-50, 1948.

ODROWAZ-SYPNIEWSKA, G. Markers of pro-inflammatory and prothrombotic state in the diagnosis of metabolic syndrome. **Advanced Medical Science**, v. 52, p. 246–250, 2007.

OLIVETTI, G.; ABBI, R.; QUAINI, F. et al. Apoptosis in the failing human heart. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 16, p. 1131-1141, 1997

PARKS, A.; O'GRADY, S.E. Chronic laminitis: current treatment strategies. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.19, p.393-416, 2003.

PARSONS, C.S.; ORSINI, J.A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73

cases (1997-2004). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.230, n.6, p.885-889, 2007.

PAWLAK, E.A.; GEOR, R.J.; WATTS, M.R.; BLACK, S.J.; JOHNSON, P.J.; BELKNAP, J.K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a and related genes in equine digital lamellae and in cultured keratinocytes. **Equine Veterinary Journal**, v.46, p. 203-209, 2014.

PAZ, C.F.R.; PAGANELA, J.C.; SANTOS, C.A.; NOGUEIRA, C.E.W.; FALEIROS, R.R. Connection between obesity, plasma insulin and placement of the distal phalanx in horses of Creole race. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.65, p.1699-1705, 2013.

PERONI, J.F.; HARRISON, W.E.; MOORE, J.N.; GRAVES, J.E.; LEWIS, S.J.; KRUNKOSKY, T.M.; ROBERTSON, T.P. Black walnut extract-induced laminitis in horses is associated with heterogeneous dysfunction of the laminar microvasculature. **Equine Veterinary Journal**, v.37, n.6, p.546-551, 2005.

POLLITT, C. C. The basement membrane at the equine hoof dermal epidermal junction. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 5, p. 399-407, 1994.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.28, n.1, p.38-46, 1996.

POLLITT, C.C. Equine laminitis: a revised pathophysiology. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v.45, p.188-192, 1999.

POLLITT, C. C. Pathophysiology of laminitis. In: DYSON, S.J.; ROSS, M.W. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 325 – 329.

POLLITT, C. C.; DARADKA, M. Equine laminitis basement membrane pathology: loss of type IV collagen, type VII collagen and laminin immunostaining. **Equine Veterinary Journal**, suppl 26, p. 139-144, 1998.

POLLITT, C.C; DAVIES, C.T. Equine laminitis: its development coincides with increased sublamellar blood flow. **Equine Veterinary Journal**, suppl.26, p.125-132, 1998.

POLLITT, C.C.; VISSER, M.B. Carbohydrate Alimentary overload laminitis. **The Veterinary Clinics of North American. Equine Practice**, v. 26, p. 65-78, 2010.

PRASSE, K.W.; ALLEN, D.JR.; MOORE, J.N.; DUNCAN, A. Evaluation of coagulation and fibrinolysis during the prodromal stages of carbohydrate-induced acute laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, n.13, p.1950-1955, 1990.

RIO TINTO, J.J.M.; ALVES, G.E.S.; FALEIROS, R.R.; SATOS, R.L.; MARQUES JÚNIOR, A.P.; MELO, E.G. Use of hydrocortisone in horses subjected to ischemia and reperfusion in the jejunum and its consequences under the laminar

corium. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.56, n.3, p.292-299, 2004.

ROBERTSON, T. P.; BAILEY, S. R.; PERONI, J. F. Equine laminitis: a journey to the dark side of venous. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, n.3-4, p.164-166, 2009.

RUCKER, A. Chronic laminitis: strategic hoof wall resection. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.26, n.1, p.197-205, 2010.

RYU, S.; KIM, B.S.; LEE, C.W.; YOON, J.; LEE, Y.L. Glucocorticoide-induced laminitis with hepatopathy in a thoroughbred filly. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.3, p.271-274, 2004.

SHOELSON, S. E.; LEE, J. GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006

SINGER, G.; GRANGER, D.N. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. **Microcirculation**, v. 14, p. 375–387, 2007

STEWART, M.L. The use of the wooden shoe (Steward Clog) in treating laminitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.26, n.1, p.207-214, 2010.

TADROS, E.M.; FRANK, N. Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.73, n.9, p.1394-1402, 2012.

TADROS, E.M.; FRANK, N.; NEWKIRK, K.M.; DONNELL, R.L.; HOROHOV, D.W. Effects of a “two-hit” model of organ damage on the systemic inflammatory response and development of laminitis in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 150, p. 90-100, 2012.

TADROS, E.M.; FRANK, N.; DONNELL, R.L. Effects of equine metabolic syndrome on inflammatory responses of horses to intravenous lipopolysaccharide infusion. **American Journal of Veterinary Research**, v.74, n.7, p. 1010-1019, 2013.

TILEY, H. A.; GEOR, R. J.; McCUTCHEON, L.J. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 7, p. 753-759, 2007.

TÓTH, F.; FRANK, N.; CHAMEROY, K.A.; BOSTONT, R.C. Effects of endotoxaemia and carbohydrate overload on glucose and insulin dynamics and the development of laminitis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.41, p.852–858, 2009.

TREIBER, K.; CARTER, R.; GAY, L.; WILLIAMS, C.; GEOR, R. Inflammatory and redox status of ponies with a history of pasture-associated laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.216-220, 2009.

VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C. Equine laminitis: cryotherapy reduces the severity of the acute lesion. **Equine Veterinary Journal**, v.36, n.3, p.255-260, 2004.

VAN EPS, A. W.; POLLITT, C. C. Equine laminitis induced with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 203–208, 2006.

VAN EPS, A.W.; POLLITT C.C. Equine laminitis model: lamellar histopathology seven days after induction with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, v.41, n.8, p.735-740, 2009.

VAN EPS, A.; COLLINS, S.N.; POLLITT, C.C. Supporting limb laminitis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.26, n.2, p.287-302, 2010.

VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C.; UNDERWOOD, C.; MEDINA-TORRES, C.E.; GOODWIN, W.A.; BELKNAP, J.K. Continuous digital hypothermia initiated after the onset of lameness prevents lamellar failure in the oligofructose laminitis model. **Equine Veterinary Journal**, v.46, n.5, p.625-630, 2014.

VICK, M. M.; ADAMS, A. A.; MURPHY, B. A.; SESSIONS, D.R.; HOROHOV, D.W.; COOK, R.F.; SHELTON, B.J.; FITZGERALD, B.P. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1144–1155, 2007.

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. The timeline of lamellar basement membrane changes during equine laminitis development. **Equine Veterinary Journal**, v.43, n.4, p.471-477, 2011.

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. The timeline of metalloprotease events during oligofructose induced equine laminitis development. **Equine Veterinary Journal**, v.44, n.1, p.88-93, 2012.

WEISS, D.J.; GEOR, R.J.; JOHNSTON, G.; TRENT, A.M. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, n.5, p.606-612, 1994.

WEISS, D. J.; TRENT, A. M.; JOHNSON, G. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 986-991, 1995.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; MCCLENAHAN, D.; FAGLIARI, J.J.; JENKINS, K. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.12, p.1376-1380, 1997.

WRAY, H.; ELLIOTT, J.; BAILEY, S.R.; HARRIS, P.A.; MENZIES-GOW, N.J. Plasma concentrations of inflammatory markers in previously laminitic ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.45, p.546-551, 2013.

YIN, C.; PETTIGREW, A.; LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v, 129, p. 211-215, 2009.

### **3 CAPÍTULO II. LEUCOPENIA, INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA LAMINAR E LESÕES LAMINARES EM CAVALOS COM SÍNDROME CÓLICA DE OCORRÊNCIA NATURAL**

#### **RESUMO**

O presente estudo teve o objetivo de identificar as lesões laminares e infiltração leucocitária no tecido laminar do casco de cavalos com síndrome cólica e sua correlação com o número de leucócitos totais antes do óbito. Seis cavalos saudáveis foram usados para compor o grupo controle (GC) e oito cavalos com doenças gastrintestinais letais foram divididos em dois grupos: grupo leucopênicos (GL), com sete cavalos com leucopenia, e grupo não leucopênicos (GNL), com 11 cavalos com número de leucócitos totais dentro dos limites de referência para a espécie. A infiltração leucocitária foi investigada por imuno-histoquímica. As lesões laminares foram observadas em ambos os grupos GL e GNL, sem diferenças quanto à gravidade entre eles. Os cavalos do grupo GL demonstraram maior infiltração leucocitária laminar quando comparado ao GC e GNL. Cavalos com síndrome cólica grave (GL e GNL) desenvolveram lesões laminares intensas sem sinais clínicos de laminite, com aumento da infiltração leucocitária laminar em cavalos leucopênicos.

**Palavras chaves:** Cavalos. Laminite. Imuno-histoquímica. Síndrome cólica. Histopatologia.

#### **LEUKOPENIA, EVALUATION OF LAMINAR LEUKOCYTE INFILTRATION AND LAMINAR LESIONS IN HORSES WITH NATURALLY OCCURING COLIC SYNDROME**

#### **ABSTRACT**

The present study was aimed at identifying laminar lesions and leukocyte infiltration in hoof laminar tissue of horses with colic syndrome and its correlation with the total leukocyte count before death. Six healthy horses were used as control group (GC), and eighteen horses with lethal gastrointestinal disease were divided into two groups: leukopenic group (GL) with seven leukopenic horses, and non-leukopenic group (GNL) with 11 horses with total leukocyte count within

reference range for the species. Leukocyte infiltration was examined by immunohistochemistry. Laminar lesions were observed in both GL and GNL, with no differences in severity between them. GL showed increase of the leukocyte infiltration in the hoof laminar tissue, when compared to GC and GNL. Horses with severe colic syndrome (GL and GNL) developed intense laminar lesions without clinical signs of laminitis, with increased leukocyte infiltration in leukopenics horses.

**Key-words:** Equine. Laminitis. Immunohistochemistry. Colic Syndrome. Histopathology.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A laminite é uma das mais graves afecções que ocorre em cavalos, e sua fisiopatogenia é parcialmente conhecida. A doença compromete o tecido laminar, responsável pela união da falange distal à muralha do casco. O tecido laminar é constituído por interdigitações formadas entre o tecido dérmico e epidérmico, unidas pela membrana basal (POLLITT, 1996).

O estudo da laminite é frequentemente realizado usando diferentes modelos experimentais de indução, os quais, entretanto, produzem resultados variados entre si. A administração de insulina está associada à laminite metabólica que ocorre em cavalos obesos e pôneis, após elevadas doses de corticóides ou em animais com disfunção da pars intermedia da pituitária (ASPLIN *et al.*, 2007). O modelo de sobrecarga por carboidratos (GARNER *et al.*, 1975; WEISS *et al.*, 1996) e extrato de noqueira preta (GALEY *et al.*, 1991) estão associados à laminite inflamatória que comumente ocorre secundária à inflamação sistêmica, como em doenças gastrintestinais (PARSONS *et al.*, 2007). Na fase prodrômica da laminite, induzida pelos modelos experimentais inflamatórios, são observados sinais clínicos como febre, taquicardia e membranas mucosas avermelhadas (MAIER, 2000). Também nesta fase há aumento de citocinas inflamatórias na corrente sanguínea (LOFTUS *et al.* 2007; FALEIROS *et al.*, 2011), infiltração leucocitária laminar (BLACK *et al.*, 2006; FALEIROS *et al.*, 2011), e alteração no número de leucócitos totais (GALEY *et al.*, 1991; LEISE *et al.*, 2011). Assim, sugere-se que a laminite inflamatória esteja relacionada a um processo de falência de múltiplos órgãos, com



comprometimento de diversos órgãos pelos mediadores inflamatórios que são deflagrados na sepse (BELKNAP *et al.*, 2009). O desenvolvimento de lesão no tecido laminar, em detrimento de outros órgãos durante o processo inflamatório sistêmico, pode estar associado ao baixo metabolismo do local, uma vez que, em condições normais, reside em ambiente profundamente hipoxêmico quando comparado a outros tecidos (PAWLAK *et al.*, 2004).

A presença de leucócitos no tecido laminar pode resultar em injúria tecidual (BLACK *et al.*, 2006) devido à liberação de substâncias como as metaloproteinases (POLLITT, 1996) e espécies reativas de oxigênio (HURLEY *et al.*, 2006). No tecido laminar de cavalos saudáveis existem raros leucócitos (FALEIROS *et al.*, 2009), e a infiltração leucocitária associada à laminite foi demonstrada na fase de desenvolvimento da doença pelos modelos experimentais (HURLEY *et al.*, 2006). A leucopenia tem sido observada logo após a administração de extrato de noqueira preta (GALEY *et al.*, 1991). No entanto, existem contradições quanto à importância dos leucócitos no desenvolvimento da lesão laminar nos diferentes modelos experimentais de laminite (LOFTUS *et al.*, 2007; LEISE *et al.*, 2011).

As afecções gastrintestinais comumente induzem laminite em cavalos gravemente enfermos (SLATER *et al.*, 1995; PIERCE *et al.*, 2010). A forte associação da laminite com a síndrome cólica ocorre porque a laminite não é considerada somente uma doença podal, mas sim a repercussão local de alterações sistêmicas, pelo envolvimento de múltiplos órgãos (HOOD, 1999). Entretanto, não é possível afirmar que os mesmos eventos laminares observados nos modelos experimentais possam ocorrer na laminite secundária a síndrome cólica.

Este estudo tem como objetivo identificar a infiltração leucocitária no tecido laminar de cavalos com afecções gastrintestinais de ocorrência natural, relacionar a intensidade da infiltração com as lesões laminares, e ao número de leucócitos totais no momento anterior ao óbito dos animais.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Comissão de Ética

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo número 038/2012).

### 3.2.2 Animais

Vinte e quatro cavalos, machos e fêmeas de diferentes raças, com idade de 2 a 15 anos e peso de 280-560 kg foram usados no experimento. Seis deles foram obtidos de um abatedouro comercial<sup>1</sup>, considerados saudáveis pelo serviço de inspeção local, e 18 cavalos acometidos por afecções gastrintestinais naturais, recebidos para tratamento em Hospitais Veterinários de instituições de ensino superior em Medicina Veterinária.

### 3.2.3 Hemograma

Amostras de sangue foram coletadas dos cavalos com afecções gastrintestinais em até seis horas antes do óbito natural ou realização da eutanásia. As amostras foram coletadas pela venipunção da jugular em tubos com anticoagulante EDTA para a realização do hemograma, em contador de células de sangue<sup>2</sup>. Esfregaços sanguíneos foram feitos imediatamente após a coleta de sangue. Os resultados obtidos foram comparados com os valores de referência ( $5,4 - 14,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) para a espécie equina (JAIN, 1986).

---

<sup>1</sup> Abatedouro e Frigorífico Pomar SA, Araguari – MG , Brasil

<sup>2</sup> BC 2800, Mindray, Nanshan, Chinaradi

### 3.2.4 Grupos Experimentais

#### 3.2.4.1 Grupo Controle (GC)

Seis cavalos obtidos de abatedouro comercial de equinos.

#### 3.2.4.2 Grupo Leucopênicos (GL)

Sete cavalos que morreram por complicações gastrintestinais, apresentando reduzido número de leucócitos totais antes do óbito.

#### 3.2.4.3 Grupo Não Leucopênicos (GNL)

Onze cavalos que morreram por complicações gastrintestinais, com número de leucócitos totais dentro dos valores de referência para a espécie antes do óbito.

### 3.2.5 Doenças Gastrintestinais

Foram coletadas informações sobre a causa da síndrome cólica, duração do quadro clínico, presença de febre no momento anterior à morte, administração de anti-inflamatórios e presença de sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica de cada cavalo.

### 3.2.6 Morfologia do Tecido Laminar

Após o óbito dos animais, o tecido laminar foi coletado procedendo-se a secção medial do casco, com remoção do tecido com auxílio de bisturi e pinça (POLLITT, 1996). De um dos animais do GNL foi possível coletar amostras somente dos membros torácicos. As amostras laminares foram fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas, sendo posteriormente processadas rotineiramente para histologia e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), e ácido periódico de Schiff (PAS). A leitura das lâminas por microscopia de luz foi realizada considerando-se os escores de alterações descritos por Pollitt (1996) com adaptações, detalhados na tabela 1.

Tabela 1 – Características morfológicas das lesões do tecido laminar, adaptado de POLLITT (1996).

<b>Escore</b>	<b>Características Morfológicas</b>
<b>0</b>	Interdigitações formadas entre lâminas epidérmicas secundárias (LES) e lâminas dérmicas secundárias (LDS) de morfologia normal, membrana basal (MB) com contorno bem delimitado e núcleo alongado das células basais (CB).
<b>1</b>	LES afiladas e alongadas, lâminas epidérmicas primárias (LEP) onduladas e CB com núcleos arredondados.
<b>2</b>	Ausência da MB em alguns segmentos, e em outros com contorno borrado e serrilhado, com alterações morfológicas mais pronunciadas nas LES e LEP.
<b>3</b>	Destruição das interdigitações e da morfologia das lâminas dérmicas e epidérmicas, especialmente na base da LEP, com aumento da distância entre o eixo queratinizado da LEP e a MB.

### 3.2.7 Imuno-Histoquímica para Calprotectina

A infiltração leucocitária laminar foi investigada nos cavalos de ambos os grupos experimentais utilizando imuno-histoquímica com o anticorpo calprotectina em cortes teciduais com 5 µm de espessura, colocados em lâminas carregadas positivamente. Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada com citrato de sódio em panela elétrica por 30 minutos. Um kit comercial foi usado para bloquear proteínas<sup>3</sup> e a peroxidase endógena<sup>4</sup>. O anticorpo policlonal anti-calprotectina feito em coelho foi diluído em 1:2000 e os cortes foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, foram incubados com polímero de imunoperoxidase universal por 30 minutos. A reação de DAB foi realizada por quatro minutos, sendo posteriormente contra-corados

<sup>3</sup> DPB-125. Spring Bioscience. Pleasanton, CA - EUA

<sup>4</sup> DHP-125. Spring Bioscience. Pleasanton, CA - EUA

com hematoxilina de Harris por 30 segundos, finalizando com baterias de álcool e xilol e montagem para leitura em microscopia óptica.

A avaliação da infiltração leucocitária no tecido laminar foi realizada utilizando-se graus de intensidade de imunomarcção (Tabela 2).

Tabela 2 – Graus de imunomarcção leucocitária

<b>Grau</b>	<b>Imunomarcção Leucocitária</b>
<b>0</b>	Raros leucócitos em vasos sanguíneos (menos do que 10 células imunocoradas no corte laminar)
<b>1</b>	Leucócitos infiltrados somente no tecido dérmico (entre 10 a 30 células imunomarcadas no corte laminar)
<b>2</b>	Infiltração leucocitária presente na lâmina dérmica interdigitada com a lâmina epidérmica (mais do que 30 células imunomarcadas no corte laminar)
<b>3</b>	Imunomarcção disseminada na lâmina epidérmica.

### 3.2.8 Análises Estatísticas

Após analisar o número de leucócitos totais, escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária laminar utilizando o teste de Shapiro Wilk, os grupos experimentais foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, o teste de correlação de Spearman foi usado para determinar a correlação entre o número de leucócitos totais, escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária laminar.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Doenças Gastrintestinais

As seguintes causas de doenças gastrintestinais foram encontradas: compactação intestinal ( $n=6$ ), sobrecarga por grãos ( $n=2$ ), deslocamento de cólon ( $n=7$ ), enterolitíase ( $n=2$ ) e duodeno jejunité proximal ( $n=1$ ), as quais

causaram a morte por isquemia, necrose, e rompimento gastrintestinal, alterações observadas na necropsia.

De acordo com a duração da afecção, quatro cavalos demonstraram sinais de cólica por menos de um dia até o óbito. Destes quatro, dois morreram após ruptura gástrica (GL), um foi diagnosticado com deslocamento de colon dorsal (GNL) e o outro com enterolitíase (GNL). Os demais cavalos demonstraram cólica entre três até dez dias antes do óbito. Com relação à presença de febre, em cinco animais verificou-se febre nas últimas horas antes da morte, dois do GL e três do GNL, e um animal do GL demonstrou hipotermia.

Todos os animais receberam pelo menos uma dose de drogas anti-inflamatórias (flunixin meglumine ou fenilbutazona), com exceção de dois cavalos que receberam dexametasona (GL e GNL).

Somente um cavalo do GNL demonstrou sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica, o qual foi diagnosticado com compactação do colon transversal, de resolução cirúrgica. Os sinais clínicos demonstrados foram aumento do pulso digital, teste de pinçamento do casco positivo e claudicação de grau 3 (graus de OBEL). Neste cavalo foi realizado tratamento para a laminite. No entanto, a condição gastrintestinal progrediu para isquemia e necrose no segmento anteriormente obstruído, o que causou a morte do animal.

### 3.3.2 Hemograma

A leucopenia foi observada em sete animais, compondo o GL, com redução de neutrófilos segmentados e linfócitos. Onze cavalos não demonstraram alterações no número de leucócitos totais, compondo o GNL. Nenhum animal do experimento apresentou aumento de leucócitos no momento anterior ao óbito. Entretanto, um cavalo do GL e três cavalos do GNL demonstraram leve leucocitose (menos que  $15,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) no momento da admissão. O cavalo do GNL que desenvolveu laminite clínica apresentou leucopenia no momento da admissão, e três dias antes da morte mostrou número de leucócitos dentro dos valores de referência. Os demais cavalos não apresentaram alterações leucocitárias no momento da admissão.

Foram observados aumento de hematócrito, e de número de hemácias e proteína total em ambos os grupos experimentais, no entanto, sem diferença significativa entre eles.

### 3.3.3 Morfologia do Tecido Laminar

Observou-se aumento da gravidade das lesões laminares nos animais com doenças gastrintestinais, de ambos os grupos GL e GNL, quando comparados ao grupo controle, no qual não foram constatadas alterações morfológicas (escore 0). Não foram observadas diferenças quanto à gravidade das lesões entre os grupos GL e GNL ( $p=0,16$ ). Dos sete cavalos do GL, quatro evidenciaram escores 1-2 de lesões laminares e três com escore 3. Todos os cavalos do GL revelaram lesões laminares em pelo menos um membro, com a mediana do grupo = 1 (Figura 1) e erro padrão de 0,21. Dos 11 cavalos do GNL, observou-se escores 1-2 de lesão laminar em seis cavalos; em dois, escore 3; e três cavalos não demonstraram lesões laminares em nenhum membro. A mediana de escore de lesão laminar do GNL foi 1 (Figura 2), com erro padrão de 0,12. Cinco cavalos, três do GL (3/7) e dois do GNL (2/11) demonstraram escore 3 de lesão laminar; um deles nos quatro membros (GL), três somente nos membros torácicos (um do GL e dois do GNL) e um somente nos membros pélvicos (GL). O cavalo do GNL que desenvolveu laminite clínica obteve escore 3 nos membros torácicos e escore 2 nos membros pélvicos.

No escore 1 foram observados alongamento e afilamento das LES, e núcleos arredondados das CB. No escore 2, contorno borrado e serrilhado da MB e LEP com ondulações. No escore 3, as alterações mais significativas foram aumento da distância entre o eixo queratinizado da LEP e a MB, especialmente na base da LEP, e destruição das interdigitações formadas entre as lâminas dérmicas e epidérmicas (Figura 3). Não foram observadas diferenças significativas entre o número e gravidade de lesões entre os membros torácicos e pélvicos.

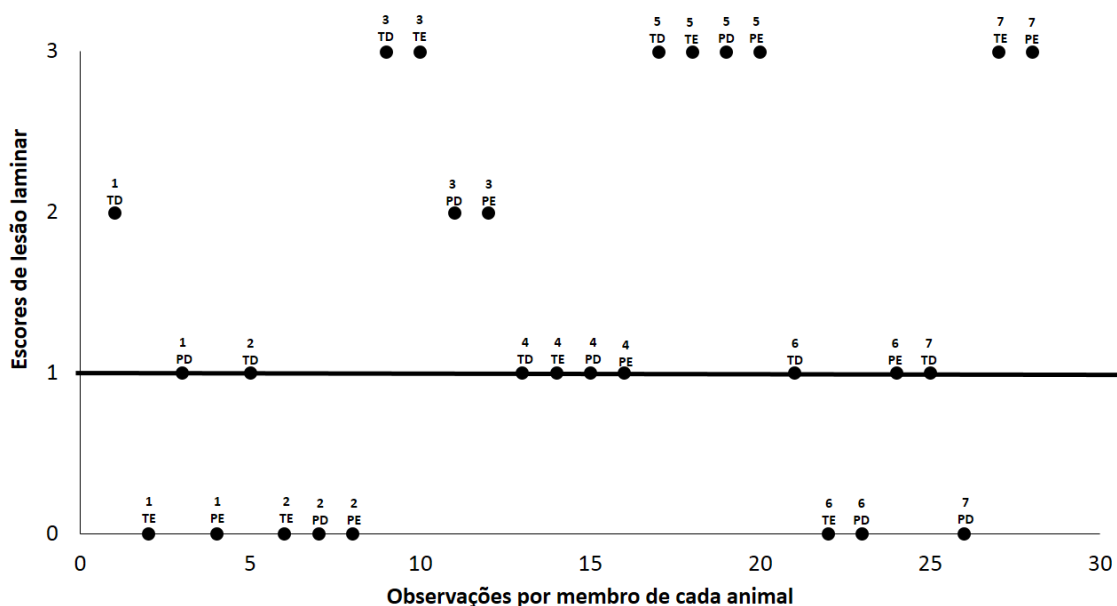


Figura 1 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar dos animais do GL, cada cavalo com quatro membros; N=sete cavalos. Legenda: identificação do cavalo (números 1-7); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.

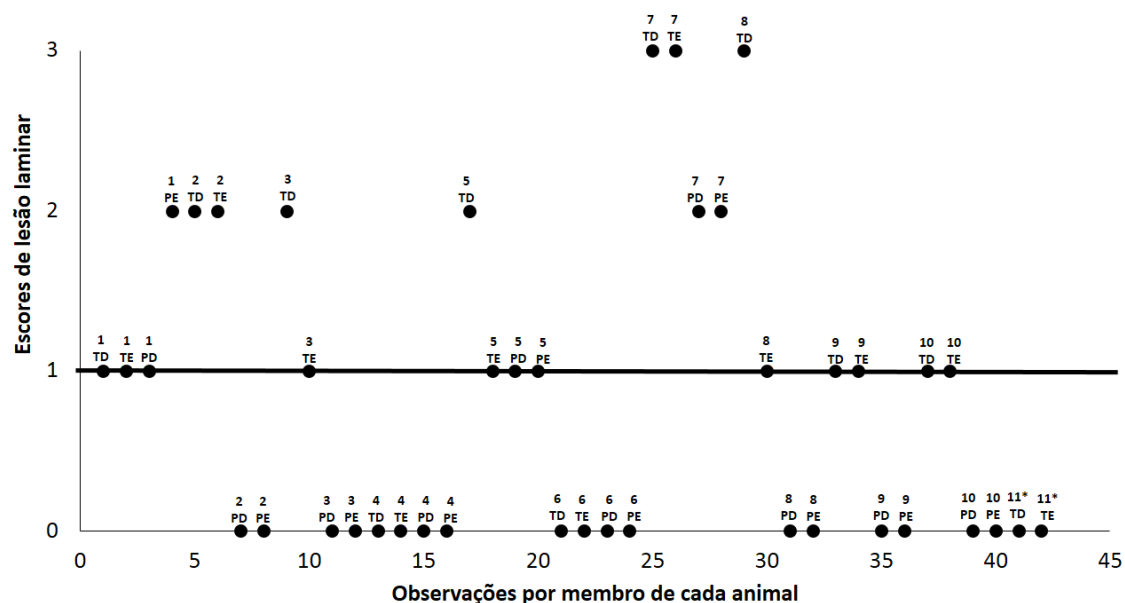


Figura 2 – Mediana, gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar dos animais do GNL, cada cavalo com quatro membros com exceção do animal 11\*, com amostras somente dos membros torácicos; N=11 cavalos. Legenda: identificação dos cavalos (1-11); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.



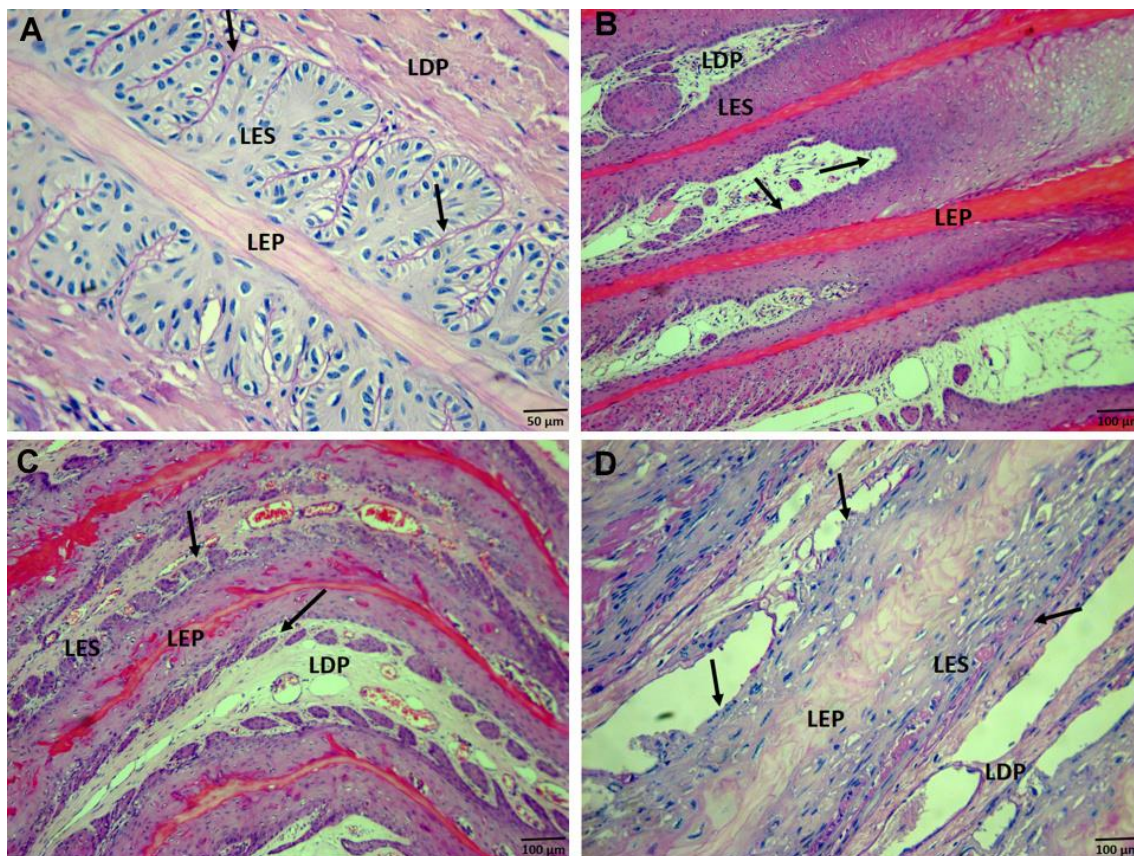


Figura 3 – Fotomicrografia do tecido laminar do casco. Escores de lesão laminar. A. Escore 0, lâminas epidérmicas secundárias (LES) arredondadas e interdigitadas com as lâminas dérmicas secundárias (LDS). Membrana basal (MB) com contorno definido (setas, GC, PAS). B. Escore 3, destruição das interdigitações, com aumento da distância entre o eixo queratinizado das lâminas epidérmicas primárias (LEP) e a MB (setas, GL, HE). C. Escore 3, destruição das interdigitações formadas entre as LES e LDS (setas, GNL, HE). D. Escore 3, ausência da MB em alguns segmentos (setas, GL, PAS). LES: lâmina epidérmica secundária; LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; MB: membrana basal; HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff.

A gravidade das lesões laminares não pôde ser associada aos seguintes dados: causas da síndrome cólica, duração da afecção, administração de drogas anti-inflamatórias e presença de febre, em decorrência da alta variabilidade de resultados e poucos animais para este objetivo.

### 3.3.4 Imunomarcacão para Calprotectina

Observou-se aumento da infiltração leucocitária laminar nos cavalos com doenças gastrintestinais quando comparados aos cavalos saudáveis (GC), e nos cavalos com leucopenia (GL) o aumento da infiltração leucocitária foi significativamente o mais elevado antes da morte. No GL, três cavalos demonstraram graus 1-2 para infiltração leucocitária e quatro cavalos obtiveram, em pelo menos um membro, grau 3 para infiltração leucocitária. Nenhum cavalo demonstrou grau 0 em todos os membros e a mediana neste grupo foi 2 (Figura 4) com erro padrão de 0,18. No GNL, sete cavalos demonstraram graus 1-2 de infiltração leucocitária e três com grau 3. Um cavalo deste grupo não demonstrou infiltração leucocitária em nenhum membro, e a mediana observada foi 1,5 (Figura 5) com erro padrão de 0,16. Todos os cavalos com lesões laminares de escore 3 demonstraram intensa imunomarcacão para calprotectina no tecido epidérmico (grau 3), a qual foi observada como marcação citoplasmática nas células basais da epiderme (Figura 6).

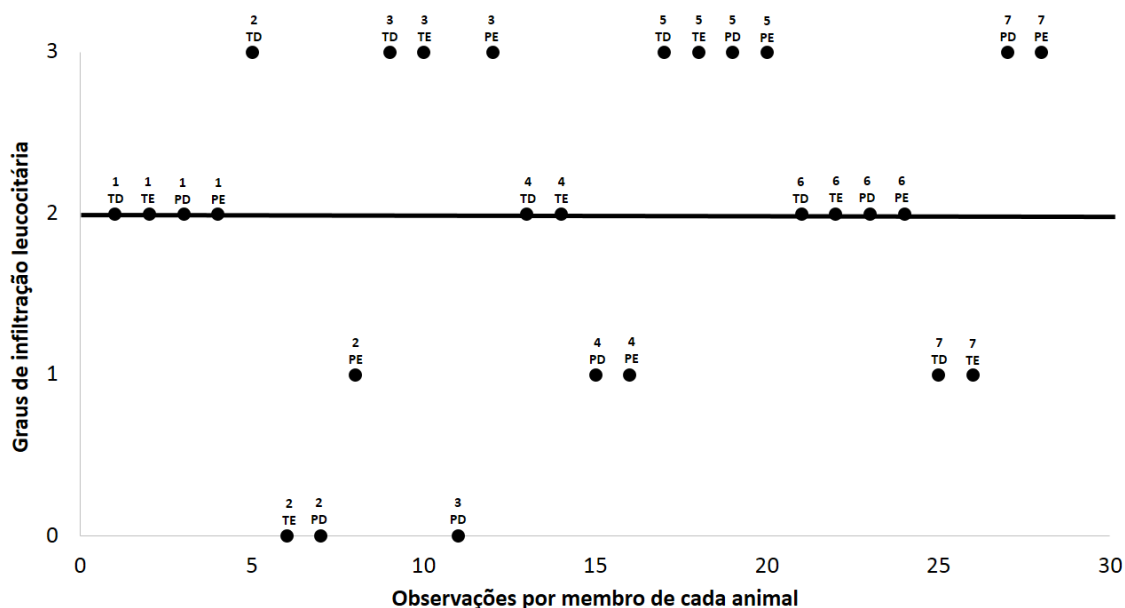


Figura 4 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes graus de infiltração leucocitária dos animais do GL, cada cavalo com quatro membros; N=sete cavalos. Legenda: Identificação dos cavalos (1-7); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.

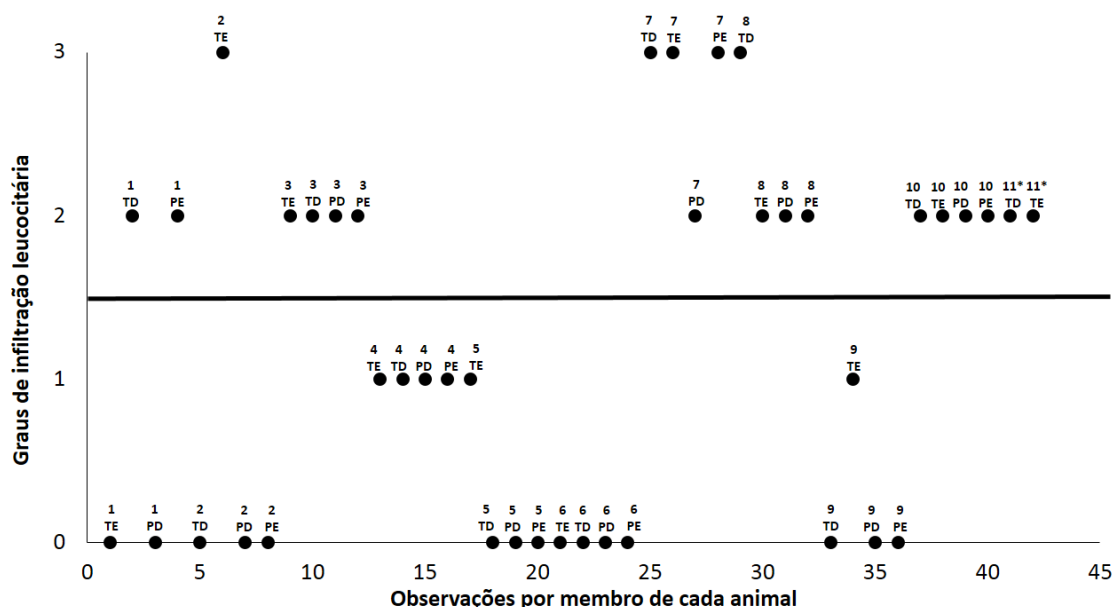


Figura 5 – Mediana e gráfico de dispersão dos diferentes graus de infiltração leucocitária dos animais do GNL, cada cavalo com quatro membros com exceção do animal 11\*, com amostras somente dos membros torácicos. N=11. Legenda: identificação dos cavalos (1-11); TD: membro torácico direito; TE: membro torácico esquerdo; PD: membro pélvico direito; PE: membro pélvico esquerdo.



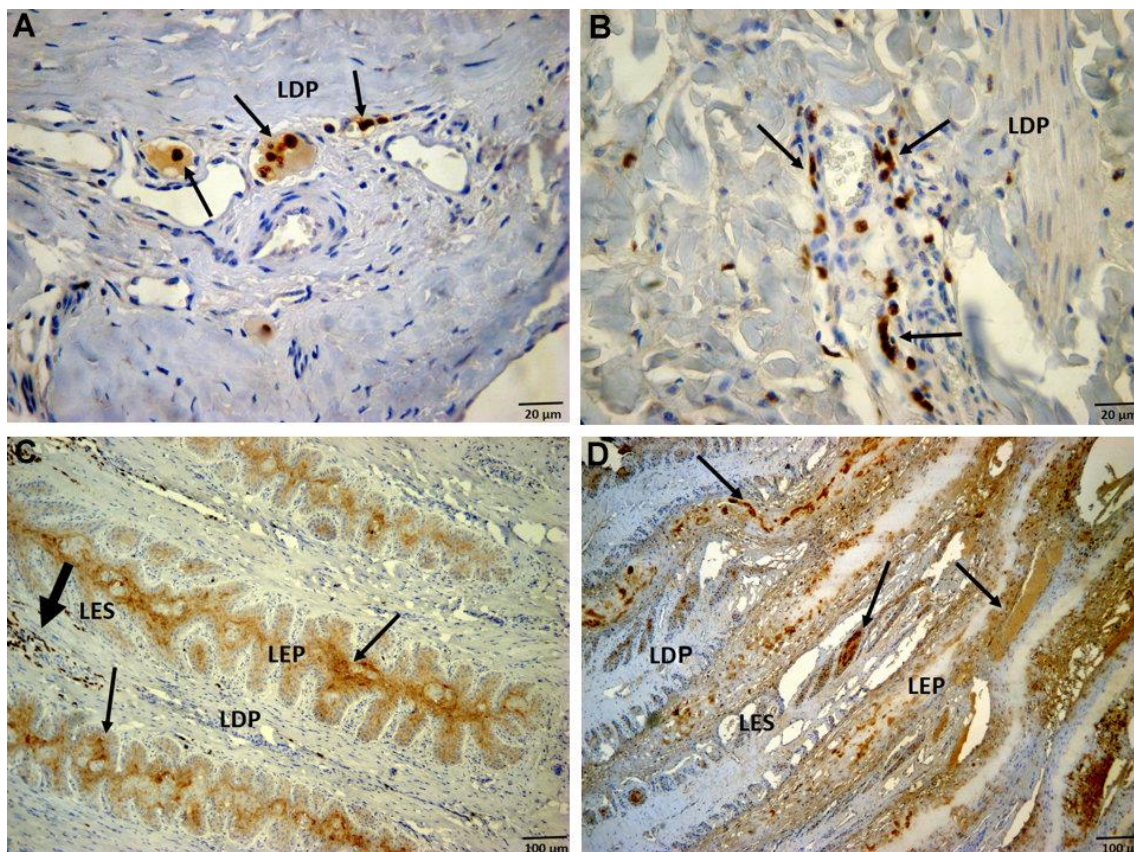


Figura 6 – Fotomicrografia do tecido laminar do casco. Imuno-histoquímica para calprotectina. A. Grau 1, imunomarcção de leucócitos em vasos sanguíneos (setas) dentro do tecido dérmico (GL). B. Grau 2, infiltração leucocitária no tecido dérmico (setas, GL). C. Grau 3, infiltração entre as interdigitações (seta espessa) e imunomarcção disseminada no tecido epidérmico (setas afiladas, GNL). D. Grau 3, imunomarcção disseminada no tecido epidérmico (setas, GL). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; LES: lâmina epidérmica secundária.

As medianas, valores mínimo e máximo do número de leucócitos totais, escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária dos grupos investigados estão demonstrados na tabela 3. Nos animais do grupo controle não foram coletadas amostras de sangue, e utilizou-se o número de leucócitos totais de referência para a espécie equina descritos por Jain (1986).

Tabela 3 – Medianas, valores mínimos e máximos do número de leucócitos totais no sangue, escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária laminar entre os grupos experimentais. Medianas com a mesma letra nas colunas não apresentam diferença significativa entre si.

<b>Grupos</b>	<b>Número de leucócitos totais (min-max) x 10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>Escores de lesão laminar</b>	<b>Escores de infiltração leucocitária</b>
<b>Controle</b>	(5,4 – 14,3)*	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
<b>Leucopênicos</b>	2,4 (0,8 – 3,5)	1 (0 – 3)	2 (0 – 3)
<b>Não leucopênicos</b>	9,8 (5,5-14,1)	1 (0 – 3)	1.5 (0 – 3)

\* (JAIN, 1986)

### 3.3.5 Correlação entre o Número de Leucócitos Totais, Escores de Lesão Laminar e Graus de Infiltração Leucocitária

Não houve correlação entre o número de leucócitos totais e escores de lesão laminar ( $r = -0,20$ ,  $p = 0,12$ ), e nem entre o número de leucócitos totais e graus de infiltração leucocitária ( $r = -0,24$ ,  $p = 0,057$ ). Houve correlação moderada entre os escores de lesão laminar e graus de infiltração leucocitária laminar ( $r = 0.64$ ,  $p = 2,64e^{-8}$ ).

A infiltração leucocitária de grau 2 foi observada em dois animais sem lesões laminares (escore 0), cada um de um grupo experimental com afecções gastrintestinais (GL e GNL).

## 3.4 DISCUSSÃO

A ocorrência de laminite secundária às doenças gastrintestinais é bem conhecida na medicina equina (PARSONS *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo demonstram que injúrias laminares graves podem ocorrer sem sinais clínicos, uma vez que somente um animal, com escore 3 de lesão laminar, desenvolveu laminite durante a evolução clínica. Provavelmente os outros quatro

cavalos com escore 3 desenvolveriam a afecção, caso sobrevivessem. Não é possível dizer o mesmo dos demais cavalos com escore 1 e 2, os quais poderiam, ou não, evoluir para a doença clínica. Na laminite induzida experimentalmente por administração de amido de milho, nem todos os cavalos desenvolvem laminite aguda, notando-se uma porcentagem de 25% de cavalos não responsivos (FALEIROS *et al.*, 2011), indicando a variação individual.

A respeito dos achados histopatológicos, notou-se que o escore 3, o qual representa a lesão mais grave e observada em cavalos com laminite clínica, demonstrou resultados diferentes quando comparado com os descritos por Pollitt (1996). Lesões na extremidade da LEP não foram tão intensas como observado por Pollitt e Visser (2010) em cavalos com laminite induzida por carboidratos. Entretanto, as lesões mais significativas encontradas nestes cinco cavalos ocorreram principalmente na base da LEP, com aumento da distância entre o eixo queratinizado e a membrana basal, observando-se intensa destruição das interdigitações entre as LES e LDS.

Atualmente, as pesquisas têm suscitado dúvidas quanto à abrangência dos mecanismos de desenvolvimento da laminite obtidos nos diferentes modelos de indução experimental. A sobrecarga por carboidrato (amido de milho e oligofrutose) é o modelo que mais se aproxima da laminite inflamatória natural, devido aos sinais clínicos de inflamação sistêmica na fase prodrômica da doença, e lesões laminares graves, semelhantes à laminite secundária às doenças agravadas pela sepsse (GARNER *et al.*, 1975; LEISE *et al.*, 2011). O modelo de indução pela administração de extrato de noqueira preta causa lesões laminares de pequena intensidade, embora com sinais clínicos evidentes de laminite (HURLEY *et al.*, 2006; LOFTUS *et al.*, 2007). Considerando os resultados do estudo em questão, houve aumento das alterações morfológicas laminares nos cavalos com afecções gastrintestinais, assemelhando-se, neste aspecto, ao modelo de indução por carboidratos.

A importância da infiltração leucocitária no desenvolvimento da laminite tem sido questionada, uma vez que os leucócitos podem tanto estar presentes no tecido laminar anteriormente à lesão, induzindo-a (HURLEY *et al.*, 2006; BELKNAP *et al.*, 2009), ou porque foram recrutados após o seu estabelecimento. Faleiros *et al.* (2011) observaram que a infiltração leucocitária laminar ocorre principalmente no momento anterior ao início da claudicação em cavalos com

laminite induzida por oligofrutose, após o desenvolvimento de lesão laminar. No entanto, o modelo de indução por extrato de noqueira preta demonstra liberação de mediadores inflamatórios teciduais, infiltração leucocitária e expressão de citocinas laminares uma hora e trinta minutos após a administração da substância, antes dos sinais clínicos (LOFTUS *et al.*, 2007; FALEIROS *et al.*, 2009). No estudo em questão, observou-se aumento da infiltração leucocitária nos animais com afecções gastrintestinais anteriormente ao desenvolvimento dos sinais clínicos, uma vez que apenas um cavalo (GNL) demonstrou sinais clínicos de laminite. O aumento de leucócitos no tecido laminar dos animais apresentou correlação moderada com a gravidade da lesão tecidual, e pode-se constatar este resultado naqueles animais com lesões laminares mais graves (escore 3) com intensa infiltração leucocitária (grau 3). A marcação de calprotectina citoplasmática no tecido epidérmico indica lesão tecidual e não somente marcação de neutrófilos e macrófagos, como já observado por Visser e Pollitt (2011) e Faleiros *et al.* (2011). Considerando que alguns animais deste estudo evidenciaram aumento de leucócitos teciduais mesmo sem lesões laminares, sugere-se que a infiltração laminar possa ocorrer antes do surgimento da lesão em casos naturais, especialmente em doenças gastrintestinais. Estes resultados diferem do observado na laminite induzida por carboidratos (FALEIROS *et al.* 2011), mas assemelha-se ao modelo de extrato de noqueira preta (BLACK *et al.*, 2006). Laskoski *et al.* (2012) observaram aumento de lipocalina associada à MMP-9, substância liberada por leucócitos, e de calprotectina no tecido laminar de cavalos após obstrução jejunal experimental, indicando o aumento de células inflamatórias laminares no período anterior ao desenvolvimento de laminite clínica.

Apesar do aumento da infiltração leucocitária em cavalos do GL, nenhuma diferença significativa quanto a severidade das lesões laminares entre os grupos GL e GNL foi observada. Entretanto, o aumento da infiltração leucocitária laminar observado em animais com leucopenia antes do óbito pode sugerir que ocorram antes das lesões laminares. Portanto, o cavalo do GNL que desenvolveu laminite pode ter sido acometido por infiltração leucocitária conjuntamente com a leucopenia observada na admissão, os quais antecederam as lesões laminares. Hurley *et al.* (2006) observaram que a leucopenia ocorre entre 2-6 horas em cavalos que receberam extrato de noqueira preta, durante o desenvolvimento

das lesões laminares, e que esta redução foi maior em cavalos que se tornaram claudicantes quando comparados aos cavalos que não desenvolveram laminite.

Pode-se sugerir que a presença de sepse, observada na maioria dos casos graves de afecções gastrintestinais (KYAW *et al.*, 2008), causa leucopenia (KWON *et al.*, 2013). As afecções gastrintestinais observadas neste estudo resultaram em lesões graves, isquemia e necrose de segmentos intestinais, e teriam maior probabilidade de deflagrar resposta inflamatória. Assim, talvez seja esta a diferença entre a laminite secundária às doenças gastrintestinais, uma vez que promove quadro de síndrome da resposta inflamatória sistêmica de maior intensidade, como ocorre no modelo de sepse experimental pela indução de punção e ligadura cecal em animais de laboratório (ZENG *et al.*, 2015).

### 3.5 CONCLUSÃO

Cavalos com doenças gastrintestinais graves podem desenvolver lesões laminares intensas, comprometendo a arquitetura laminar antes mesmo de demonstrar sinais clínicos de laminite. Cavalos com leucopenia possuem maior infiltração leucocitária laminar do que cavalos não leucopênicos, o que provavelmente antecede as lesões laminares.

### REFERÊNCIAS

ASPLIN, K.E.; SILLENCE, M.N.; POLLITT, C.C.; MCGOWAN, C.M. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. **The Veterinary Journal**, v.174, p. 530–535, 2007.

BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.155-157, 2009.

BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S.D.; BELKNAP, J.K. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 161–166, 2006.

FALEIROS, R.R.; NUOVO, G.J.; BELKNAP, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 174–81, 2009.



FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO G.J.; MESSER N.T.; BLACK S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar Leukocyte Accumulation in Horses with Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 107-115, 2011.

GALEY, F.D.; WHITELEY, H.E.; GOETZ, T.E.; KUENSTLER, A.R.; DAVIS, C.A.; BEASLEY, V.R. Black walnut (*Juglans nigra*) toxicosis: a model for equine laminitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 104, p. 313–326, 1991.

GARNER, H.E.; COFFMAN, J.R.; HAHN, A.W.; HUTCHESON, D.P.; TUMBLESON, M.E. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 441–444, 1975.

HOOD, D.M. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.15, p. 325-343, 1999.

HURLEY, D.J.; PARKS, R.J.; REBER, A.J.; DONAVAN, D.C.; OKINAGA, T.; VANDENPLAS, M.L.; *et al.* Dynamic changes in circulating leukocytes during the induction of equine laminitis with black walnut extract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, p. 195–296, 2006.

JAIN, N.C. The Horse: normal Hematology with comments on response to disease. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. Lea and Febiger, Philadelphia, 141 pp., 1986.

KWON, S.; MOORE, J.N.; ROBERTSON, T.P.; HURLEY, D.J.; WAGNER, B.; VANDENPLAS, M.L. Disparate effects of LPS infusion and carbohydrate overload on inflammatory gene expression in equine laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 155, p. 1-8, 2013.

KYAW, W.O.; UHLIG, A.; KÖLLER, G.; SACK, U.; SCHUSSER, G.F. Free hemoglobin and tumor necrosis factor-alpha in the blood of horses with colic or acute colitis. **Berliner and Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 121, p. 440-445, 2008.

LASKOSKI, L.M.; VALADAO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; FALEIROS, R.R.; MENDES, H.M.F.; FERRUCCI, D.; SILVA, J.A.; STACH MACHADOS, D.R. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e calprotectina no tecido laminar de equinos após obstrução jejunal, tratados ou não com hidro cortisona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 817-823, 2012.

LEISE, B.S.; FALEIROS, R.R.; WATTS, M.; JOHNSON, P.J.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Laminar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, p. 54-61, 2011.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A.; ABRAHANSEN, E.J.; BELKNAP, J.K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 1205-1211, 2007.

MAIER, R.V. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome— endotoxin, inflammatory cells, and their mediators: cytokines and reactive oxygen species. **Surgical Infections**, v. 1, p. 197–204, 2000.

PARSONS, C.S.; ORSINI, J.A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997-2004). **Journal of American Veterinary Medical Association** v. 230, p. 885-889, 2007.

PAWLAK, E.A.; GEOR, R.J.; WATTS, M.R.; BLACK, S.J.; JOHNSON, P.J.; BELKNAP, J.K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and related genes in equine digital lamellae and in cultured keratinocytes. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 203-209, 2004.

PIERCE, R.L.; FISCHER, A.T.; ROHRBACH, B.W.; KLOHNEN, A. Postoperative complications and survival after enterolith removal from the ascending or descending colon in horses. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 609-615, 2010.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 38-46, 1996.

POLLITT, C.C.; VISSER, M.B. Carbohydrate Alimentary overload laminitis. **The Veterinary Clinics of North American. Equine Practice**, v. 26, p. 65-78, 2010.

SLATER, M.R.; HOOD, D.M.; CARTER, G.K. Descriptive epidemiological study of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, p. 364-367, 1995.

VISSER, M.B.; POLLITT, C.C. Lamellar leukocyte infiltration and involvement of IL-6 during oligofructose-induced equine laminitis development. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, p. 120-128, 2011.

WEISS, D.J.; MONREAL, L.; ANGLES, A.M.; MONASTERIO, J. Evaluation of a thrombin-antithrombin complexes and fibrin fragment D in carbohydrate-induced acute laminitis. **Research in Veterinary Science**, v. 61, p. 157-159, 1996.

ZENG, M.; HE, W.; LI, L.; LI, B.; LUO, L.; HUANG, X.; GUAN, K.; CHEN, W.; Ghrelin Attenuates Sepsis-Associated Acute Lung Injury Oxidative Stress in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 683-690, 2015.

#### **4 CAPÍTULO III. ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO LAMINAR DO CASCO DE CAVALOS COM AFECÇÕES GASTRINTESTINAIS LETAIS**

##### **RESUMO**

O dano tecidual causado pelo estresse oxidativo relaciona-se com a patogênese de diversas afecções em animais e no homem, e acredita-se que possa estar envolvido também no desenvolvimento das lesões laminares em cavalos. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de estresse oxidativo associado às lesões laminares em cavalos com doenças gastrintestinais letais. Amostras do tecido laminar de 30 cavalos foram utilizadas, divididas da seguinte forma: seis cavalos saudáveis (grupo controle – GC), e 24 cavalos que morreram após complicações gastrintestinais (grupo doenças gastrintestinais – GDG). Foram avaliadas as imunomarcações para superóxido dismutase (SOD2) e nitrotirosina, bem como a severidade das lesões laminares. Somente cavalos do GDG demonstraram lesões laminares e imunomarcações para SOD2 e nitrotirosina. O estresse oxidativo pode estar associado à fisiopatogenia das lesões laminares secundárias às doenças gastrintestinais.

**Palavras chaves:** Laminite. Cavalo. Nitrotirosina. Superóxido dismutase. Imuno-histoquímica.

#### **OXIDATIVE STRESS IN HOOF LAMINAR TISSUE OF HORSES WITH LETHAL GASTROINTESTINAL DISEASES**

##### **ABSTRACT**

Tissue damage caused by oxidative stress is related to the pathogenesis of several diseases in animals and in man, and is believed to play a role in the development of laminitis in horses. The objectives of this study were to investigate the oxidative stress associated with laminar lesions in horses with lethal gastrointestinal disorders. Laminar tissue samples of the hoof of 30 horses were used, divided as follows: six healthy horses (control group - GC), and 24 horses that died after gastrointestinal complications (group suffering from gastrointestinal disorders - GDG). Immunostaining with superoxide dismutase (SOD2) and nitrotyrosine as well as severity of laminar lesions were evaluated.

Laminar lesions and immunostaining for nitrotyrosine and SOD2 were only evident in horses from the GDG group. Thus, oxidative stress may play a role in the pathogenesis of laminar lesions secondary to gastrointestinal disorders.

**Key-words:** Laminitis. Equine. Nitrotyrosine. Superoxide Dismutase. Immunohistochemistry

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A laminite é uma grave afecção podal que se desenvolve frequentemente em cavalos após episódios graves de doenças gastrintestinais (PARSONS *et al.*, 2007). A lesão ocorre no tecido laminar, localizado entre a muralha do casco e a falange distal, responsável pela adesão destas estruturas (POLLITT, 1996; KARIKOSKI *et al.*, 2014).

O estudo da laminite geralmente é realizado por meio da indução da afecção por modelos experimentais inflamatórios como a administração de oligofrutose e extrato de noqueira preta (LOFTUS *et al.*, 2006; FALEIROS *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2013) ou induzindo laminite endocrinopática pela administração de insulina (DE LAAT *et al.*, 2012). No entanto, a presença de lesões morfológicas no tecido laminar do casco pode ser observada também pela indução de afecções gastrintestinais (LASKOSKI *et al.*, 2010) ou em casos naturais de síndrome cólica grave, mesmo sem sinais clínicos de laminite (LASKOSKI *et al.*, 2015).

Existem teorias que explicam a laminite secundária a afecções inflamatórias. A teoria isquêmica sugere que a doença ocorra por redução da irrigação sanguínea laminar causada por vasoconstrição ou trombos obstrutivos vasculares (WEISS *et al.*, 1994; NOSCHKA *et al.*, 2009a). A degradação do colágeno existente na membrana basal por metaloproteinases já foi apontada também como causadora da lesão (POLLITT, 1996). A laminite metabólica, que ocorre em cavalos com alterações endócrinas, possui semelhanças com a afecção induzida por modelos inflamatórios, como resistência à insulina e hiperglicemia (TOTH *et al.*, 2009). Mais recentemente, tem-se verificado a ocorrência de inflamação local e sistêmica, associada ao desenvolvimento da laminite (LOFTUS *et al.*, 2007; FALEIROS *et al.*, 2009). No entanto, existe uma

grande variabilidade entre os estudos, e nenhuma destas teorias e achados experimentais pode ser unicamente aceito para todos os casos de laminite.

O estresse oxidativo está relacionado a patogenia de diversas afecções, causando injúria celular (BERG *et al.*, 2004). Os peroxinitritos são derivados da reação do óxido nítrico com ânions superóxidos (CARRERAS *et al.*, 1994), sendo um potente agente bactericida e parasiticida, cujos produtos podem levar a formação de substâncias que causam dano oxidativo tecidual (ZHU *et al.*, 1992; ALVAREZ *et al.*, 2004), induzindo toxicidade pela oxidação do triptofano e cisteína, nitração da tirosina, formação de ditirosina e fragmentação proteica (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995). Enquanto os ânions superóxidos e óxido nítrico são gerados quase que exclusivamente pelas células endoteliais, o peroxinitrito pode ser gerado pela reação destas duas substâncias no meio extracelular (FREI *et al.*, 1988; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A nitrotirosina é resultado da nitração de resíduos da tirosina por peroxinitritos, e tem sido utilizada como marcador de estresse oxidativo (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995).

O estresse oxidativo ocorre quando a quantidade de substâncias responsáveis pelo dano oxidativo excedem a capacidade de neutralização pelo sistema antioxidante tecidual (MACDONALD *et al.*, 2003). A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante importante, presente no meio celular e extracelular, prevenindo a decomposição do óxido nítrico e promovendo a vasodilatação, além de catalisar a decomposição de ânions superóxido, levando a proteção do endotélio e demais tecidos pela inibição consequente da formação de peroxinitritos (BECKMAN *et al.*, 1990).

A lesão do tecido laminar causada por estresse oxidativo tem sido apontada por alguns autores. Yin *et al.* (2009) observaram que ocorre o aumento laminar de um aldeído lipídico que causa peroxidação lipídica na fase de desenvolvimento da laminite pela administração de extrato de noqueira preta, e que este aumento ocorre também depois do início dos sinais clínicos, não havendo alteração desta substância no pulmão, fígado e intestino. de Laat *et al.* (2012) observaram aumento de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em cavalos com laminite induzida pela administração de insulina, substâncias que quando ligadas a seus receptores incitam liberação de mediadores inflamatórios e induzem estresse oxidativo. No entanto, este aumento não ocorre na fase de

desenvolvimento. Amostras do tecido laminar do casco, tanto de cavalos saudáveis quanto de cavalos com laminite induzida por extrato de noqueira preta, não apresentaram SOD endógena quando comparada a fígado, pulmão e pele. Já a xantina oxidase e catalase estão presentes em todos os tecidos, inclusive no tecido laminar do casco, não havendo diferenças entre cavalos hígidos ou com laminite (LOFTUS *et al.* 2006).

O objetivo deste estudo foi de avaliar a presença e imunolocalização da SOD e nitrotirosina no tecido laminar do casco de cavalos saudáveis e cavalos com síndrome cólica letal de ocorrência natural, e investigar se estes achados estão associados ao desenvolvimento da injúria laminar.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Comissão de Ética

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo número 038/2012).

### 4.2.2 Animais

Amostras do tecido laminar dos quatro membros foram coletadas após o óbito de trinta cavalos, machos e fêmeas de diferentes raças, pesando entre 280-560kg, divididos em dois grupos experimentais: Grupo Controle (GC), com seis cavalos saudáveis de abatedouro comercial (idade entre 6-10 anos), e Grupo Doenças Gastrointestinais (GDG), com 24 cavalos que morreram ou foram submetidos à eutanásia após complicações causadas por afecções gastrointestinais (idade entre 2-15 anos).

#### 4.2.3 Delineamento Experimental

##### 4.2.3.1 Grupo Controle (GC)

Seis cavalos sem raça definida, considerados saudáveis pelo serviço de inspeção local de um abatedouro comercial de equinos (Abatedouro e Frigorífico POMAR, Araguari – Minas Gerais, Brasil).

##### 4.2.3.2 Grupo Doenças Gastrintestinais (GDG)

Com 24 cavalos acometidos por doenças gastrintestinais letais naturais, recebidos para tratamento em Hospitais Veterinários de instituições de ensino superior. As causas das afecções gastrintestinais foram: duodeno jejunité proximal (n=1), sobrecarga gástrica por grãos (n=2), enterolitíase (n=4), compactação intestinal (n=6) e deslocamento de colon (=11), as quais causaram a morte ou levaram à indicação de eutanásia por causarem isquemia e necrose de alças intestinais e/ou ruptura gastrintestinal. Todos os cavalos foram avaliados, durante o período de evolução da doença, para a presença de claudicação associada à laminite.

#### 4.2.4 Morfologia do Tecido Laminar

Após a morte dos animais, amostras do tecido laminar dos quatro membros foram coletadas com auxílio de bisturi e pinça após secção da parede do casco (POLLITT, 1996). As amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 48 horas, e então processadas rotineiramente e coradas com hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação histológica. A avaliação foi realizada por microscopia de luz, baseada nas referências descritas por Pollitt (1996) com adaptações (LASKOSKI *et al.*, 2015), e a severidade das lesões laminares foram classificadas usando escores 0,1, 2 e 3 (Capítulo II, tabela 1).

#### 4.2.5 Imuno-histoquímica para Nitrotirosina e SOD2

Nitrotirosina e SOD2 foram investigadas no tecido laminar dos cavalos dos grupos GC e GDG utilizando imuno-histoquímica, com cortes de tecido

embebidos em parafina com 5 µm de espessura colocados em lâminas carregadas positivamente. Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada usando citrato de sódio em panela elétrica por 30 minutos. Um kit comercial foi usado para bloquear proteínas<sup>5</sup> e peroxidase endógena<sup>6</sup>. Anticorpo monoclonal anti-3 nitrotirosina<sup>7</sup> feito em camundongo foi diluído em 1:6000, e o anticorpo policlonal anti-SOD<sup>8</sup> feito em coelho foi diluído em 1:4000. Ambos os anticorpos foram incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com polímero de imunoperoxidase universal por 30 minutos. A reação de diaminobenzidina (DAB) teve duração de 4 minutos; e então foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos, finalizando com baterias de álcool e xilol, e as lâminas foram montadas para leitura em microscopia de luz.

A avaliação da imunomarcção para nitrotirosina foi realizada atribuindo-se escores para a intensidade de imunomarcção, observada nos cavalos do GDG (Tabela 1).

Tabela 1 – Escores de imunomarcção para nitrotirosina no tecido laminar

<b>Escores</b>	<b>Imunomarcção para nitrotirosina</b>
<b>0</b>	Ausência de imunomarcção em todo o corte laminar
<b>1</b>	Imunomarcção em leucócitos intravasculares e células endoteliais, localizados na lâmina dérmica.
<b>2</b>	Imunomarcção observada nas interdigitações formadas entre as lâminas dérmicas e epidérmicas, e resíduos de nitrotirosina teciduais.
<b>3</b>	Imunomarcção disseminada, observada nas interdigitações formadas entre as lâminas dérmicas e epidérmicas (com resíduos de nitrotirosina).

<sup>5</sup> DPB-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA

<sup>6</sup> DHP-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA

<sup>7</sup> AB 61392, ABCAM, San Francisco, USA

<sup>8</sup> AB 13534, ABCAM, San Francisco, USA



A avaliação da imunomarcção para SOD2 laminar foi realizada atribuindo-se escores de intensidade de imunomarcção (ausente, fraca, moderada e forte) (Tabela 2).

Tabela 2 – Escores de imunomarcção para SOD no tecido laminar.

<b>Escores</b>	<b>Imunomarcção para SOD2</b>
<b>0</b> <b>(ausente)</b>	Ausência de imunomarcção em todo o corte laminar.
<b>1</b> <b>(fraca)</b>	Imunomarcção de fraca intensidade, observada na extremidade da lâmina epidérmica.
<b>2</b> <b>(moderada)</b>	Imunomarcção de moderada intensidade, observada na extremidade da lâmina epidérmica.
<b>3</b> <b>(forte)</b>	Imunomarcção de forte intensidade, observada na lâmina epidérmica em todo o corte laminar.

#### 4.2.6 Análises Estatísticas

O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar os escores de lesão laminar e de imunomarcção para nitrotirosina e SOD2 entre os grupos GC e GDG. Adicionalmente, o teste de correlação de Spearman foi utilizado entre os escores de lesão laminar e imunomarcção para nitrotirosina e SOD2. Em todos os testes considerou-se  $p < 0.05$  como significativo.

#### 4.3 RESULTADOS

Lesões laminares e imunomarcções para nitrotirosina e SOD2 não foram observadas nos cavalos saudáveis (GC). Todos os escores de lesão laminar (Figura 1) e imunomarcção para nitrotirosina (Figura 2) e SOD2 (Figura 3) foram observados nos cavalos do GDG, com medianas superiores aos cavalos do GC (Tabela 3). Um cavalo do GDG desenvolveu sinais clínicos de laminite, com aumento do pulso digital, teste do pinçamento do casco positivo e claudicação grau 3 de OBEL em membros torácicos. A cólica neste animal foi causada por compactação do colon transversal, tratada cirurgicamente. No período pos-

operatório, o animal demonstrou grave claudicação e recebeu tratamento para laminite. Após uma semana, a afecção gastrointestinal agravou-se, gerando necrose no segmento anteriormente obstruído, o que resultou na morte do cavalo.

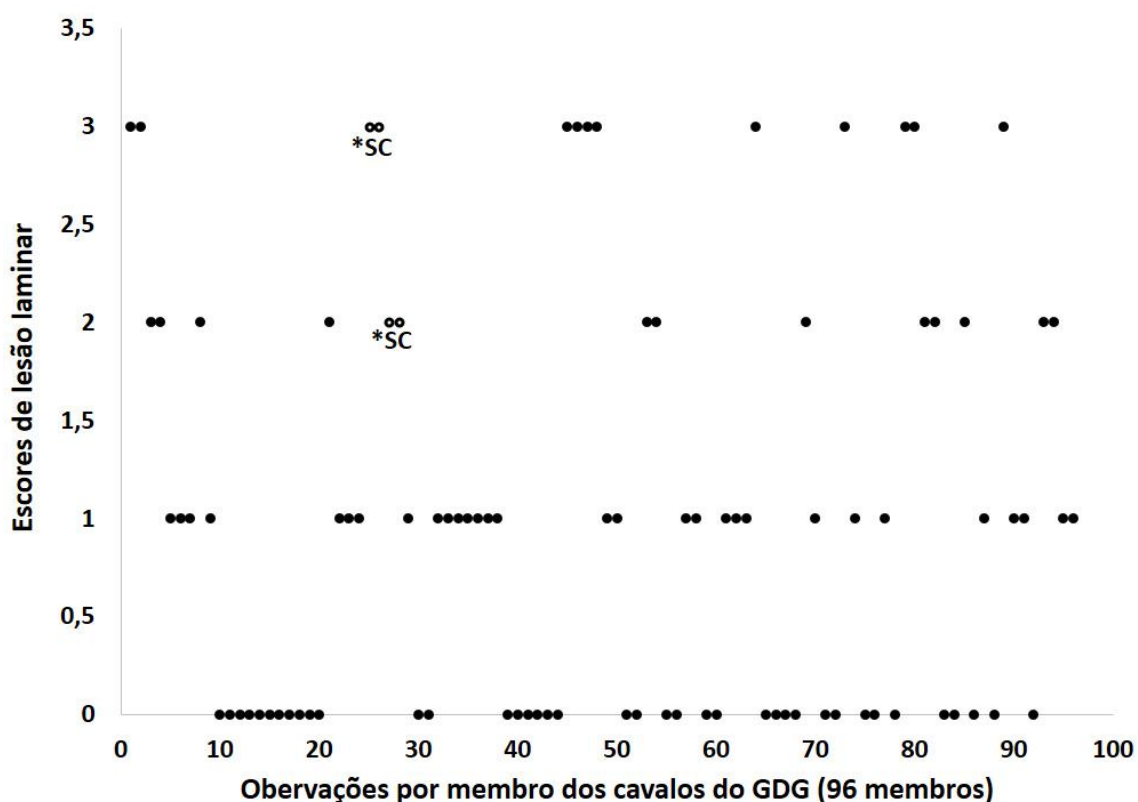


Figura 1 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de lesão laminar observados nos cavalos do GDG (n=24, cada cavalo com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).

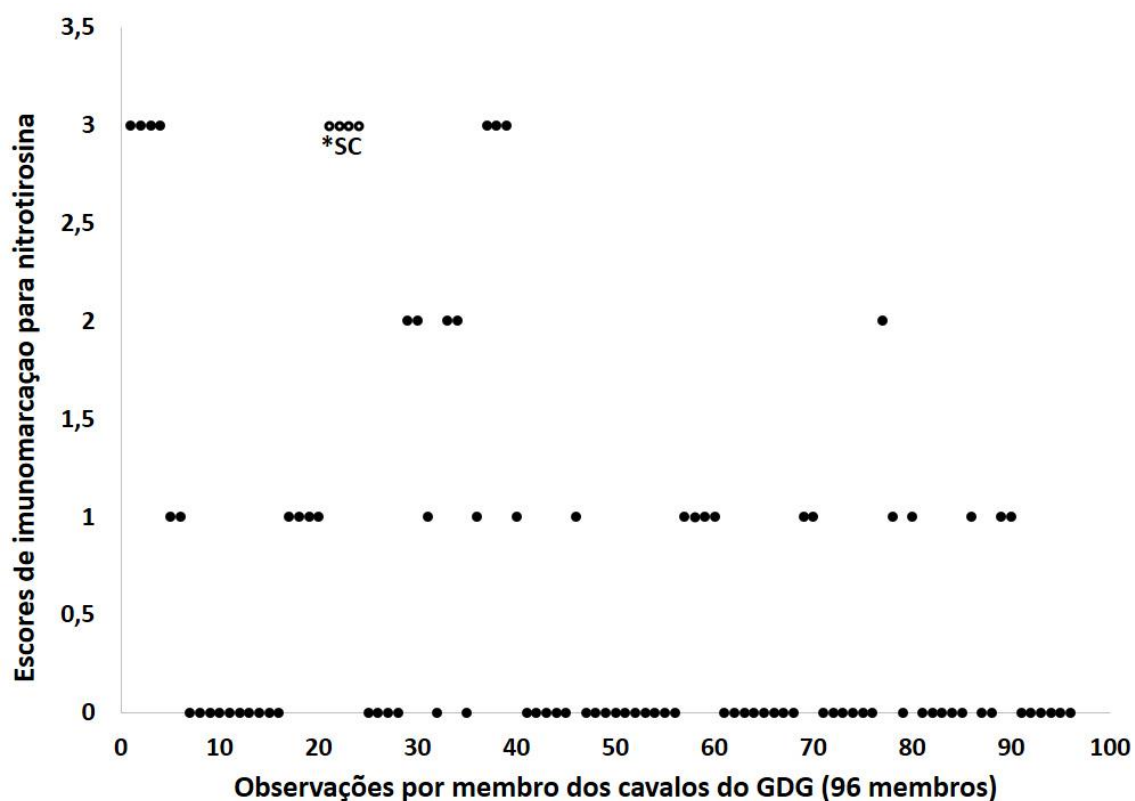


Figura 2 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de imunomarcacão para nitrotirosina observados nos cavalos do GDG (n=24 cavalos, cada animal com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).

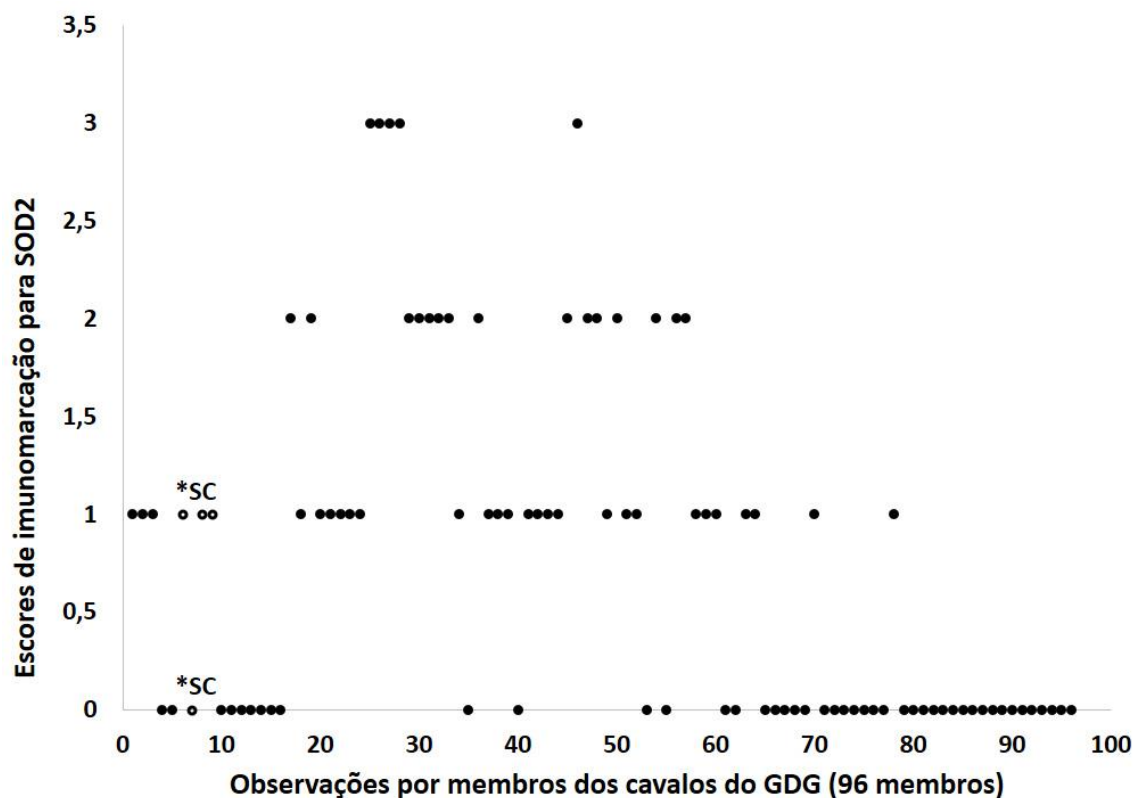


Figura 3 – Gráfico de dispersão dos diferentes escores de imunomarcacão para SOD2 observados nos cavalos do GDG (n=24 cavalos, cada cavalo com quatro membros). \*SC: cavalo com sinais clínicos de laminite durante a evolução clínica (pontos sem preenchimento).

Tabela 3 – Medianas e amplitude inter-quartis para os escores de lesão laminar e imunomarcacões de nitrotirosina e SOD2 em cavalos dos grupos GC e GDG ( $p < 0,05$ ). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística

	Lesão laminar	Imunomarcacão para nitrotirosina	Imunomarcacão para SOD2
<b>GC</b>	0 (0-0) a	0 (0-0) a	0 (0-0) a
<b>GDG</b>	1 (1-2) b	0 (0-1) b	1 (0-1) b

As principais alteracões morfológicas no tecido laminar observadas foram núcleos arredondados das células basais (CB), estreitamento e afilamento das lâminas epidérmicas secundárias (LES), ondulações nas lâminas epidérmicas

primárias (LEP), ausência da membrana basal (MB) em alguns segmentos, com contorno borrado e serrilhado em outros. Cinco cavalos demonstraram escore de lesão laminar 3, com destruição das interdigitações e aumento da distância entre o eixo queratinizado da LEP e membrana basal. Destes cinco cavalos, um demonstrou sinais clínicos de laminite, verificando-se escore 3 nos membros torácicos e escore 2 nos membros pélvicos.

A imunomarcção para nitrotirosina foi observada na lâmina dérmica, no citoplasma e no núcleo das células endoteliais e em leucócitos, e também como resíduos de nitrotirosina tecidual ou em vasos sanguíneos, mas somente nos cavalos do GDG (Figura 4). Dos cinco cavalos com escore 3 de lesão laminar, dois não demonstraram imunomarcção para nitrotirosina, dois demonstraram escore 1 de imunomarcção e somente o cavalo que desenvolveu laminite demonstrou escore 3 de imunomarcção para nitrotirosina em todos os membros.

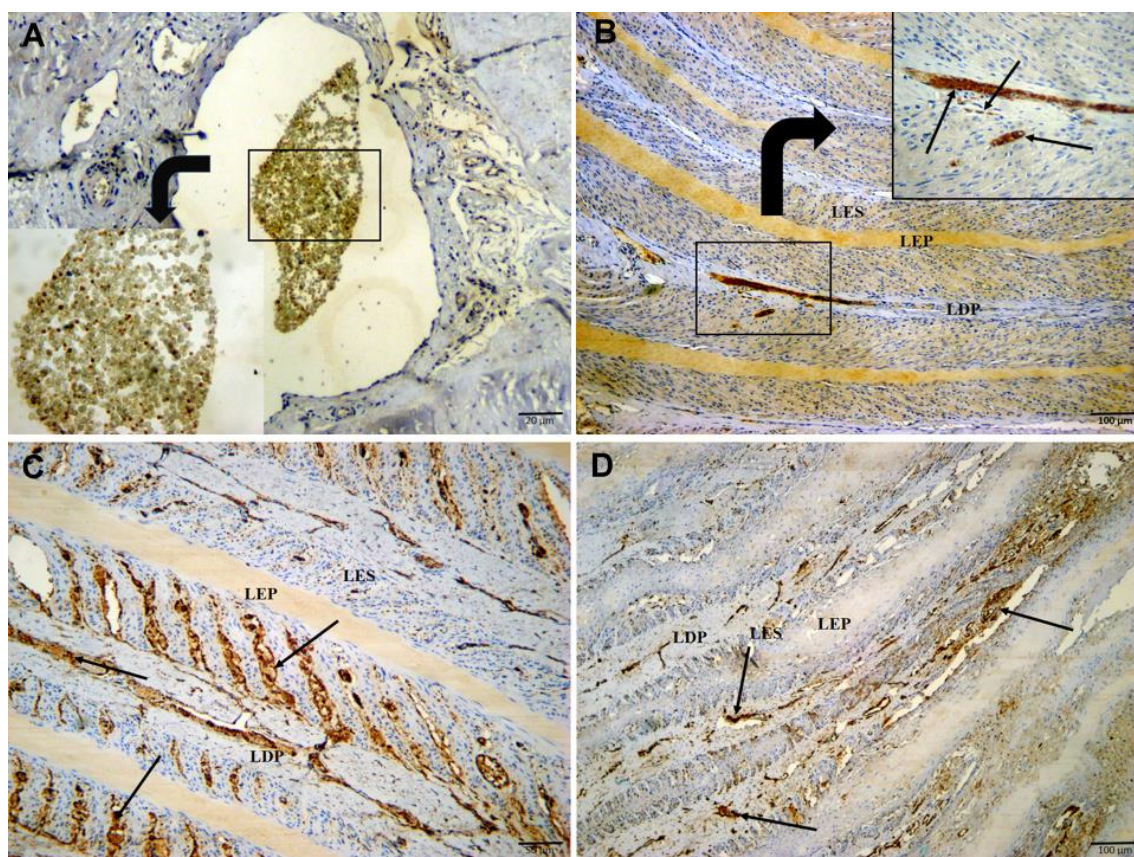


Figura 4 – Fotomicrografia do tecido laminar de cavalos (GDG). Imuno-histoquímica para nitrotirosina. A. Escore 1, imunomarcção de leucócitos em vasos sanguíneos (área magnificada) localizados na lâmina dérmica. B. Escore 2, imunomarcção de leucócitos, células endoteliais e resíduos de nitrotirosina (área magnificada, setas), localizados entre as lâminas dérmicas e epidérmicas. C e D. Escore 3, imunomarcção disseminada entre as interdigitações formadas pelas lâminas dérmicas e epidérmicas (setas). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidermica primária; LES: lâmina epidermica secundária.

A imunomarcção para SOD2 ocorreu no citoplasma celular e foi considerada específica e positiva na lâmina epidermica (Figura 5). A mais intensa imunomarcção para SOD2 (escore 3) foi observada somente nos membros com lesões laminares graves de dois cavalos. Imunomarcções de intensidades fraca e moderada foram observadas até em membros sem lesões laminares, mas somente nos cavalos do GDG. O cavalo do GDG que desenvolveu laminite clínica demonstrou escore 1 de imunomarcção para SOD2 nos membros torácicos e membro pélvico esquerdo e escore 0 no membro pélvico direito.



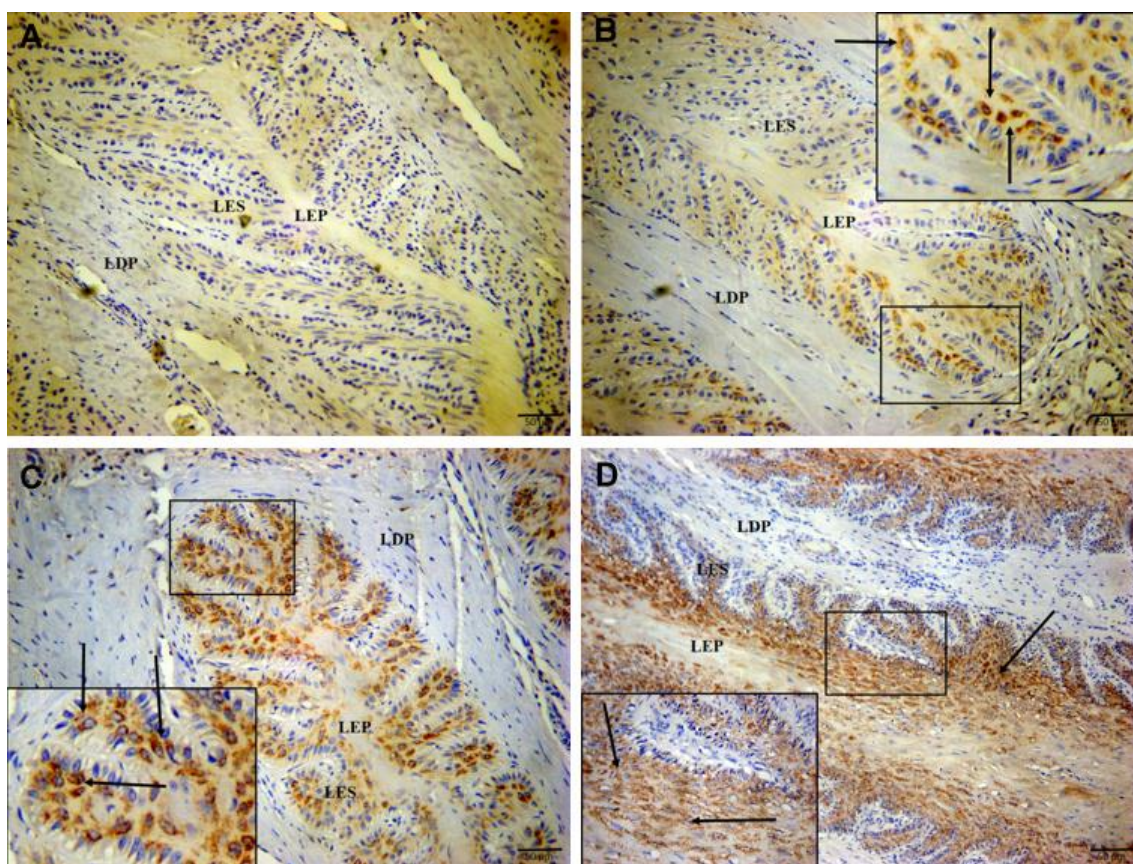


Figura 5 – Fotomicrografia do tecido laminar de cavalos (GDG). Imuno-histoquímica para SOD2. A. Escore 0, sem imunomarcção (negativa). B. Escore 1, imunomarcção de fraca intensidade na extremidade das lâminas epidérmicas (área magnificada, setas). C. Escore 2, imunomarcção de intensidade moderada na extremidade das lâminas epidérmicas (área magnificada, setas). D. Escore 3, imunomarcção de forte intensidade em toda a lâmina epidérmica (área magnificada, setas). LDP: lâmina dérmica primária; LEP: lâmina epidérmica primária; LES: lâmina epidérmica secundária.

Não foi observada correlação entre os escores de lesão laminar e imunomarcção para nitrotirosina ( $r=0,07$  e  $p=0,04$ ), escores de lesão laminar e imunomarcção para SOD2 ( $r=0,21$  e  $p=0,056$ ), e escores de imunomarcção para nitrotirosina e SOD2 ( $r=0,28$  e  $p=0,005$ )

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento sobre a laminite secundária à síndrome cólica. A presença de nitrotirosina, observada

somente nos cavalos com síndrome cólica e não nos animais hípidos, está relacionada ao estresse oxidativo, por ser um produto de peroxinitritos, utilizada como marcador tecidual da presença destas substâncias (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995). O peroxinitrito é uma espécie reativa secundária relacionado a processos patológicos, especialmente ligações irreversíveis a proteínas (SZABÓ *et al.*, 2007; WEIDINGER; KOZLOV, 2015).

Não houve correlação entre a imunomarcagem para nitrotirosina e as lesões laminares. No entanto, sabe-se que o peroxinitrito promove a degeneração tecidual, e que sua formação ocorre anteriormente ao desenvolvimento da lesão (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995; SZABÓ *et al.*, 2007; WEIDINGER; KOZLOV, 2015), o que pode explicar os resultados encontrados nos cavalos com lesões laminares de escore 3. Destes cinco, somente o cavalo que havia demonstrado laminite clínica evidenciou elevada imunomarcagem para nitrotirosina. Os demais apresentaram fraca imunomarcagem, indicando que o estresse oxidativo possa ter ocorrido antes da lesão.

O estresse oxidativo tem sido pesquisado como causa de injúria laminar. de Laat *et al.* (2012) observaram aumento na concentração de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em cavalos com laminite induzida por insulina. Estas substâncias, quando ligadas a seus receptores, causam a liberação de mediadores inflamatórios e induzem estresse oxidativo. Yin *et al.* (2009) demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre durante as fases prodrômica e aguda da laminite induzida por extrato de noqueira preta. Burns *et al.* (2011) não encontraram evidências de peroxidação lipídica com a substância - 4 HNE (4-hidroxinonenal) na laminite induzida por carboidratos. No estudo em questão, a imunomarcagem para nitrotirosina foi observada em leucócitos e células endoteliais dérmicas, corroborando com os resultados obtidos por Burns *et al.* (2011), e estes autores não observaram, no entanto, as fortes imunomarcações evidenciadas no estudo atual. Em ambos os estudos, houve imunomarcagem disseminada no tecido epidérmico em alguns cavalos, não sendo, porém, considerada como positiva. Diferente dos resultados observados por Burns *et al.* (2011), os cavalos hípidos deste estudo não demonstraram imunomarcagem positiva para nitrotirosina, somente os cavalos do GDG.



A imunomarcção para SOD2 foi encontrada somente nos cavalos com doenças gastrintestinais, com ou sem lesão laminar, e foi identificada como positiva na lâmina epidérmica, como previamente detectado na pele humana (KIM, 2013). A enzima SOD é um importante antioxidante celular também presente no meio extracelular. Ela previne a decomposição do óxido nítrico e cataliza a decomposição dos ânions superóxidos, levando a proteção do endotélio e outros tecidos devido a formação reduzida de peroxinitritos (BECKMAN *et al.*, 1990). Entretanto, uma vez que o peroxinitrito esteja formado, não há nenhuma ação da SOD sobre ele (WEIDINGER; KOZLOV, 2015). A ausência de SOD foi observada nos cavalos saudáveis deste estudo, corroborando com os resultados de Loftus *et al.* (2006). A ausência deste antioxidante provavelmente contribui para a injúria causada pelo estresse oxidativo, não somente pelo peroxinitrito, mas também por outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A imunomarcção para SOD2 em cavalos com doenças gastrintestinais não foi correlacionada ao desenvolvimento das lesões laminares, uma vez que alguns cavalos sem lesão do GDG demonstraram imunomarcção para SOD2. A presença de SOD2 somente foi observada nos cavalos do GDG, o que provavelmente indica que o tecido laminar expressa a enzima após o estímulo primário que leva ao desenvolvimento das lesões laminares, como reportado por Noschka *et al.* (2009b). A imunomarcção para a SOD2 de forte intensidade (escore 3) só foi observada nos cavalos do GDG com graves lesões laminares.

Considerando que este estudo foi conduzido em animais acometidos por doenças gastrintestinais naturais, não foi possível padronizar a causa da afecção gastrintestinal, gravidade e tempo de desenvolvimento com as injúrias laminares e imunomarcções realizadas. Entretanto, um estudo com casos clínicos de síndrome cólica foi desenvolvido por Steelman *et al.* (2014) com o objetivo de detectar laminite nestes cavalos. Estes autores não consideraram as variáveis que ocorrem nestes casos; eles somente consideraram que os cavalos estavam em risco de desenvolver SRIS/sepsse secundária às doenças gastrintestinais. Existe uma forte correlação entre as doenças gastrintestinais e o desenvolvimento de SRIS (FALEIROS *et al.*, 2008; MOORE; VANDENPLAS, 2014). A avaliação do status inflamatório não foi realizada, mas de acordo com Kyaw *et al.* (2008), existe um aumento na concentração de mediadores

inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), em cavalos com doenças gastrintestinais graves. Assim, como os animais deste estudo morreram por complicações de afecções gastrintestinais, sugere-se que eles estavam com SRIS de diferentes intensidades. O estresse oxidativo ocorre na sepse/SRIS, deflagrando aumento de espécies reativas primárias como o óxido nítrico, e secundárias como peroxinitritos. Observa-se, inclusive, aumento de antioxidantes como a SOD (CUZZOCREA *et al.*, 2006, CONSTANTINO *et al.*, 2014), provavelmente estimulados por mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  (BECKMAN *et al.*, 1990; SEIJA *et al.*, 2012; PEI *et al.*, 2015). Assim, uma vez que os cavalos adoeceram por afecções gastrintestinais graves, sugere-se que a ativação e liberação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio possam ter ocorrido em consequência da SRIS desenvolvida nestes animais.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Sugere-se que o estresse oxidativo possa estar envolvido na indução das lesões laminares em cavalos acometidos por doenças gastrintestinais graves, com a participação do peroxinitrito e de SOD2.

### REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M.N.; PIACENZA, L.; IRIGO, F.; PELUFFO, G.; RAFAEL RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 222–232, 2004.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**. v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BERG, K.; WISETH, R.; BJERVE, K.; BRUROK, H.; GUNNES, S.; SKARRA, S.; JYNGE, P.; BASU, S. Oxidative stress and myocardial damage during elective percutaneous coronary interventions and coronary angiography. A comparison of blood-borne isoprostane and troponin release. **Free Radical Research**, v. 38, p. 517-525, 2004.
- BURNS, T.A.; WESTERMAN, T.; NUOVO, G.J.; WATTS, M.R.; PETTIGREW, A.; YIN, C.; BELKNAP, J.K. Role of Oxidative Tissue Injury in the

Pathophysiology of Experimentally Induced Equine Laminitis: A Comparison of two Models. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 540-548, 2011.

CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Letters**, v. 341, p. 65-68, 1994.

CONSTANTINO, L.; GONÇALVES, R.C.; GIOMBELLI, V.R.; TOMASI, C.D.; VUOLO, F.; KIST, L.W.; DE OLIVEIRA, G.M.; PASQUALI, M.A.; BOGO, M.R.; MAUAD, T.; HORN, A. JR.; MELO, K.V.; FERNANDES, C.; MOREIRA, J.C.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. **Intensive Care Medicina Experimental**, v. 1, p. 1-11, 2014.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; PAOLA, R.; ESPOSITO, E.; MACARTHUR, H.; MATUSCHAK, G.M.; SALVEMINI, D. A Role for Nitric Oxide-Mediated Peroxynitrite Formation in a Model of Endotoxin-Induced Shock. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p. 73-81, 2006.

DE LAAT, M.A.; KYAW-TANNER, M.T.; SILENCE, M.N.; MCGOWAN, C.M.; POLLITT, C.C. Advanced glycation end products in horses with insulin-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p.395-401, 2012.

FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.S.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; MOORE, R.M. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 68-76, 2008.

FALEIROS, R.R.; NUOVO, G.G.; BELKNAP, J.K. Calprotectin in myeloid and epithelial cells of laminae from horses with black walnut extract-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 174-181, 2009.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 85, p. 9748-9752, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, p. 1-8, 1990.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letters**, v. 364, p. 279-282, 1995.

KARIKOSKI, N.P.; PATTERSON-KANE, J.C.; ASPLIN, K.E.; MCGOWAN, T.W.; MCNUTT, M.; SINGER, E.R.; MCGOWAN, C.M. Morphological and cellular changes in secondary epidermal of laminae horses with insulin-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 75, p. 161-168, 2014.

KIM, C.H. Expression of Extracellular Superoxide Dismutase Protein in Diabetes. **Archives of Plastic Surgery**, v. 40, p. 517-521, 2013.

KYAW, W.O.; UHLIG, A.; KÖLLER, G.; SACK, U.; SCHUSSER, G.F. Free hemoglobin and tumor necrosis factor-alpha in the blood of horses with colic or acute colitis. **Berliner and Munchener Tierarztliche Wochenschrift Journal**, v. 121, p. 11-12, 2008.

LASKOSKI, L.M.; VALADÃO, C.A.A.; VASCONCELOS, R.O.; SOUZA, A.H.; FALEIROS, R.R.; AMORIM, R.L. Morphological abnormalities and apoptosis in lamellar tissue of equines after intestinal obstruction and treatment with hydrocortisone. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1331-1339, 2010.

LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.A.; DECONTO, I.; GONÇALVES, K.A.; MONTIANI-FERREIRA, F.; BRUM, J.S.; DE BRITO, H.F.; DE SOUSA, R.S. Systemic leukopenia, evaluation of laminar leukocyte infiltration and laminar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 15-21, 2015.

LIMA, L.R.; MENDES, H.M.F.; MAGALHÃES, J.F.; MARKOWICZ, L.C.; CAVALCANTI, C.B.; PAES LEME, F.O.; TEIXEIRA, M.M.; FALEIROS, R.R. Clinical and hematological evaluation of horses subjected to oligofructose-induced laminitis treated or not with a CXCR1/2 antagonist. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 992-998, 2013.

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; STANKIEWICZ, K.M.; BLACK, S.J. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, p. 48-53, 2006.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A.; ABRAHAMSEN, E.J.; BELKNAP, J.K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 1205-1211, 2007.

MACDONALD, J.H.F.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, p. 221-232, 2003.

MOORE, J.N.; VANDENPLAS, M.L. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, p. 337-351, 2014.

NOSCHKA, E.; MOORE, J.N.; PERONI, J.F.; LEWIS, S.J.; MORROW, J.D.; ROBERTSON, T.P. Thromboxane and isoprostanes as inflammatory and vasoactive mediators in black walnut heartwood extract induced equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 200-210, 2009a.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M.L.; HURLEY, D.J.; MOORE, J.N. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 242-253, 2009b.

PARSONS, C.S.; ORSINI, J.A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997-2004). **JAVMA**, v. 230, p. 885-889, 2007.

PEI, H.; SONG, X.; PENG, C.; TAN, Y.; LI, Y.; LI, X.; MA, S.; WANG, O.; HUANG, R.; YANG, D.; LI, D.; GAO, E.; YANG, Y. TNF- $\alpha$  inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress. **Free Radical Biology & Medicina**, v. 82, p. 114-121, 2015.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 38-46, 1996.

SEIJA, M.; BACCINO, C.; NIN, N.; SANCHEZ-RODRIGUEZ C.; GRANADOS, R.; FERRUELO, A.; MARTINEZ-CARO, L.; RUIZ-CABELLO, J.; NOBOA, M.O.; ESTEBAN A.; LORENTE, J.A. Role of peroxynitrite in sepsis induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. **Shock**, v. 38, p. 403-410, 2012.

STEELMAN, S.M.; JOHNSON, P.; JACKSON, A.; SCHULZE, J.; CHOWDHARY, B.P. Serum metabolomics identifies citrulline as a predictor of adverse outcomes in an equine model of gut-derived sepsis. **Physiological Genomics**, v. 46, p. 339-347, 2014.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 662-680, 2007.

TOTH, F.; FRANK, N.; CHAMEROY, K.A.; BOSTONT, R.C. Effects of endotoxaemia and carbohydrate overload on glucose and insulin dynamics and the development of laminitis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, p. 852-860, 2009.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A.V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, p. 472-484, 2015.

WEISS, D.J.; GEOR, R.J.; JOHNSTON, G.; TRENT, A.M. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 606-612, 1994.

YIN, C.; PETTIGREW, A.; LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 211-215, 2009.

ZHU, L.; GUNN, C.; BECKMAN, J.S. Bactericidal activity of peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, p. 452–457, 1992.

## **5 CAPÍTULO IV. LESÕES LAMINARES EM EQUINOS SOB ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO, ACOMETIDOS POR AFECÇÕES GASTROINTESTINAIS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE OU DE OCORRÊNCIA NATURAL**

### **RESUMO**

A laminite em equinos pode estar associada a lesão de múltiplos órgãos secundária a sepse. Foram utilizados 21 cavalos com afecções gastrointestinais, sendo 7 com endotoxemia e isquemia intestinal induzidos experimentalmente, e 14 cavalos com síndrome cólica de origem natural. Amostras teciduais de pulmão, rim, fígado, coração, cérebro e cerebelo e de tecido laminar do casco foram coletadas para avaliação da histopatologia, e de estresse oxidativo, pela imunomarcacão de nitrotirosina e superóxido dismutase (SOD2). Os animais foram divididos em dois grupos: grupo sem lesão oxidativa (GSLO), com sete cavalos com fraca imunomarcacão em fígado, rim e pulmão para nitrotirosina, considerada normal; e grupo lesão oxidativa (GLO), contendo 14 cavalos com moderada a forte imunomarcacão em múltiplos órgãos para nitrotirosina, indicando estresse oxidativo sistêmico. Os cavalos do grupo GLO apresentaram aumento de lesões laminares e imunomarcacão em múltiplos órgãos para SOD2, quando comparados ao GSLO. Não houve diferença entre a imunomarcacão laminar para nitrotirosina e SOD2. Conclui-se que o estresse oxidativo sistêmico está associado ao desenvolvimento de lesões laminares.

**Palavras-chaves:** Laminite. Nitrotirosina. Peroxinitrito. Superóxido dismutase. Sepse. Falência de múltiplos órgãos.

### **LAMINAR LESIONS IN HORSES WITH SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS, COMMITTED BY EXPERIMENTALLY INDUCED OR NATURALLY OCCURRING GASTROINTESTINAL DISORDERS**

#### **ABSTRACT**

Laminitis in horses can be associated with the multiple dysfunctions secondary to sepsis. Twenty one horses with gastrointestinal disorders were used in the experiment, being seven with experimentally induced endotoxemia and intestinal ischaemia, and 14 horses suffering from naturally occurring colic syndrome.

Tissue samples of lungs, liver, heart, brain, cerebellum and hoof laminar tissue were collected to histopathological and oxidative stress evaluation using nitrotyrosine and superoxide dismutase (SOD2) immunostaining. The horses were divided into two groups: The non oxidative lesions group (GSLO), with seven horses showing weak immunostaining in liver, kidney and lung for nitrotyrosine, considered normal; and the oxidative lesions group (GLO), with 14 horses showing moderate to strong immunostaining in multiple organs for nitrotyrosine, indicating systemic oxidative stress. The horses from the GLO showed increase of laminar lesions and SOD2 in multiple organs immunostaining when compared to the horses from the GSLO. No differences were found between laminar immunostaining by nitrotyrosine and SOD2. It was concluded that systemic oxidative stress can be associated with the development of laminar lesions.

**Key words:** Laminitis. Nitrotyrosine. Peroxynitrite. Superoxide dismutase. Sepsis. Multiple organ failure.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A laminite é uma grave afecção podal que acomete equinos, e que ocorre normalmente secundária a doenças inflamatórias com envolvimento sistêmico, como a síndrome cólica (PARSONS *et al.*, 2007), ou ainda em cavalos com alterações endócrinas, como acometidos pela disfunção da pars intermédia da pituitária (PPID) (JOHNSON *et al.*, 2002), os quais podem apresentar lesões laminares mesmo sem sinais clínicos de laminite (LASKOSKI *et al.* 2015a; LASKOSKI *et al.* 2015b).

Existem diversas similaridades da laminite com a disfunção de múltiplos órgãos que ocorre na sepse ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) humana (BELKNAP *et al.*, 2009), como a presença de sinais clínicos sistêmicos em cavalos com laminite induzida compatíveis com a SRIS (TADROS *et al.*, 2012), aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos (LOFTUS *et al.*, 2007), infiltração leucocitária (FALEIROS *et al.*, 2011) e expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido laminar do casco (FONTAINE *et al.*, 2001; RIGGS *et al.*, 2007).



O estresse oxidativo está implicado no desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos na sepse (GALLEY, 2010), pela reação de radicais livres com proteínas celulares, lipídeos e ADN (BERG *et al.*, 2004), e tem sido apontado na patogenia das lesões laminares (LOFTUS *et al.*, 2006, YIN *et al.*, 2009, DE LAAT *et al.*, 2012). Os peroxinitritos são oxidantes oriundos da reação do óxido nítrico com ânions superóxido (CARRERAS *et al.*, 1994), e têm como principal função destruir microorganismos invasores pela ligação irreversível a proteínas, mas que consequentemente causam injúria celular (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995, SZABÓ *et al.*, 2012, WEIDINGER; KOZLOV, 2015). O marcador tecidual do peroxinitrito é a nitrotirosina (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995).

Estados não patológicos podem deflagrar estresse oxidativo associado à resposta imune do organismo, como ocorre fisiologicamente no fígado, que está exposto às toxinas advindas do intestino pela veia porta (NOLAN; CAMARA, 1985; COGGER *et al.*, 2004). Portanto, a imunomarcagem para a nitrotirosina pode ser observada em tecidos sem lesão, como no fígado (OTTESEN *et al.*, 2001), rim (KONG *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015) e pulmões (HADDAD *et al.*, 1994) de seres humanos e animais saudáveis. Órgãos como coração, cérebro e cerebelo não demonstram a presença de nitrotirosina em animais saudáveis (TANAKA *et al.*, 1997; BODEGA *et al.*, 2006; SZABÓ *et al.*, 2012).

Existem antioxidantes teciduais que controlam a gravidade das lesões geradas pelos oxidantes, como a enzima superóxido dismutase (SOD), e um desequilíbrio de antioxidantes e oxidantes afeta a capacidade neutralizante tecidual, resultando em injúria oxidativa (BECKMAN *et al.*, 1994; MACDONALD *et al.*, 2003). Loftus *et al.* (2006) demonstraram que a SOD não está presente no tecido laminar do casco de cavalos saudáveis. O aumento desta substância ocorre após o desenvolvimento de lesão laminar do casco e em outros órgãos, provavelmente numa tentativa de reduzir os efeitos deletérios das espécies oxidantes liberadas (LOFTUS *et al.* 2006; GIMENEZ-GARZO *et al.*, 2015). Na sepse induzida em ratos, ocorre o aumento de nitrotirosina e de SOD, mas a capacidade antioxidante é insuficiente para proteger os pulmões nos casos graves (CONSTANTINO *et al.*, 2014)

O objetivo deste estudo foi avaliar a gravidade das lesões laminares em equinos com evidências de estresse oxidativo sistêmico, acometidos por afecções gastrintestinais de ocorrência natural ou induzidas experimentalmente.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Animais

Foram utilizados 21 cavalos, machos e fêmeas de diferentes raças, com idade variando de 2 a 15 anos, peso de  $350 \pm 150$  kg, dos quais sete foram submetidos a isquemia intestinal experimental e administração de lipopolissacarídeo, e 14 animais que morreram em decorrência de complicações causadas por afecções gastrintestinais de origem natural.

### 5.2.2 Delineamento Experimental

#### 5.2.2.1 Indução Experimental de Isquemia intestinal e Endotoxemia

As amostras foram obtidas do estudo "Aspectos clínicos-laboratoriais do uso do azul de metileno na obstrução experimental do jejuno em equinos expostos ao lipopolissacarídeo", aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – Unesp Jaboticabal, sob o número de protocolo 12471-07. Os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar. Utilizou-se a dose de 50 ng/kg de cepa de *E. coli* 055:B5 (Sigma), diluída em solução fisiológica a 0,9%, infundida por via intravenosa durante 30 minutos. Uma hora e 30 minutos após a indução de endotoxemia, os animais foram sedados pela administração de cloridrato de acepromazina e cloridrato de detomidina, IV, sendo posteriormente realizada anestesia local na fossa paracostal esquerda com cloridrato de lidocaína com vasoconstritor a 2%, sob o método de "L" invertido. Em seguida, foi realizada a exposição do intestino delgado, com o cavalo em posição quadrupedal. Um dreno de penrose número 3 foi inserido em forma de laçada em toda a parede intestinal a 30 cm da prega ileocecal em sentido oral, obstruindo a irrigação mesentérica por três horas. Após este período, a isquemia foi desfeita pela retirada do dreno de Penrose, e o segmento anteriormente obstruído foi reposicionado e submetido a um período de reperfusão de 7 horas e 30 minutos. Posteriormente, o animal foi submetido a eutanásia por superdosagem anestésica.

#### 5.2.2.2 Doenças Gastrointestinais Naturais

Os cavalos foram recebidos em Hospitais Veterinários de instituições de ensino superior para atendimento de síndrome cólica de ocorrência natural. As causas das afecções gastrointestinais foram: sobrecarga gástrica por grãos (n=2), enterolitíase (n=2), compactação intestinal (n=4) e deslocamento de cólon (n=6), os quais causaram a morte ou levaram à indicação de eutanásia devido a isquemia, necrose e/ou ruptura gastrointestinal. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, sob o número de protocolo 038/2012.

#### 5.2.3 Amostras Teciduais e Histopatologia

Amostras teciduais de pulmão, coração, rim, fígado, cérebro, cerebelo e tecido laminar foram coletadas de todos os cavalos. Amostras de tecido laminar foram coletadas dos quatro membros, após secção da parede do casco e remoção com auxílio de bisturi e pinça, contendo a interface entre as lâminas dérmicas e epidérmicas (POLLITT, 1996). Todas as amostras foram fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, e rotineiramente processadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para posterior avaliação em microscopia de luz, para investigar a presença de lesões em múltiplos órgãos e no tecido laminar. Foi realizada a coloração histoquímica com ácido periódico de Schiff (PAS) no tecido laminar. As alterações do tecido laminar foram realizadas seguindo as descrições de POLLITT (1996) com adaptações feitas por LASKOSKI *et al.* (2015b) – capítulo II, tabela 1.

#### 5.2.4 Imuno-histoquímica para Nitrotirosina e SOD2

A nitrotirosina e SOD2 foram investigadas nos órgãos e tecido laminar pela utilização de imuno-histoquímica. Cortes de tecido embebidos em parafina foram feitos com 5 µm de espessura, e colocados em lâminas carregadas positivamente. Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada usando citrato de sódio em panela elétrica por 30 minutos. Um kit comercial foi

usado para bloquear proteínas<sup>9</sup> e peroxidase endógena<sup>10</sup>. Anticorpo monoclonal anti-3 nitrotirosina<sup>11</sup> feito em camundongo foi diluído em 1:6000, e o anticorpo policlonal anti-SOD2<sup>12</sup> feito em coelho foi diluído em 1:4000. Ambos os anticorpos foram incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com polímero de imunoperoxidase universal por 30 minutos. A reação de diaminobenzidina (DAB) teve duração de 4 minutos; e então foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos, finalizando com baterias de álcool e xilol, e as lâminas foram montadas para leitura em microscopia óptica.

A avaliação da imunomarcação para nitrotirosina e SOD2 nos órgãos foi realizada atribuindo-se escores de intensidade de imunomarcação, de acordo com os resultados obtidos nos grupos experimentais. A avaliação no tecido laminar do casco foi realizada seguindo a descrição de escores de intensidade de imunomarcação de LASKOSKI *et al.* (2016) – capítulo III, tabelas 1 e 2.

#### 5.2.5 Grupos Experimentais

Os cavalos foram divididos em dois grupos, de acordo com a intensidade de imunomarcação para nitrotirosina nos órgãos:

##### 5.2.5.1 Grupo Sem Lesão Oxidativa (GSLO)

Sete cavalos com imunomarcação de fraca intensidade em fígado, rim e pulmão, consideradas como normais em animais saudáveis, pelas características destes órgãos (contato com micro-organismos e/ou toxinas).

---

<sup>9</sup> DPB-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA

<sup>10</sup> DHP-125. Spring Bioscience. Pleasanton, USA

<sup>11</sup> AB 61392, ABCAM, San Francisco, USA

<sup>12</sup> AB 13534, ABCAM, San Francisco, USA

#### 5.2.5.2 Grupo Lesão Oxidativa (GLO)

Com 14 cavalos com imunomarcacão de intensidade moderada a forte em fígado, rim e pulmão, e presença de imunomarcacão no coração e sistema nervoso (cérebro e/ou cerebelo).

#### 5.2.6 Análises Estatísticas

As medianas encontradas para os escores de lesão laminar, imunomarcacão para nitrotirosina laminar, imunomarcacões para SOD2 em múltiplos órgãos e laminar foram comparadas entre os grupos experimentais utilizando o teste de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ).

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Grupos Experimentais

Dois cavalos com isquemia intestinal e endotoxemia induzidas experimentalmente foram incluídos no GSLO, e os outros cinco cavalos incluídos no GLO. Análises estatísticas anteriores demonstraram que não havia diferença entre nenhuma das variáveis analisadas ao comparar os cavalos com doenças gastrintestinais induzidas experimentalmente e cavalos com afecções de ocorrência natural, e assim, os dados de todos os cavalos puderam ser utilizados.

#### 5.3.2 Avaliação Histopatológica

Todos os cavalos apresentaram congestão leve a acentuada em todos os órgãos, com exceção de dois animais, cada um pertencendo a um grupo experimental. Observou-se, no fígado, necrose centrolobular moderada em um cavalo do GSLO, e no rim necrose tubular cortical aguda em um cavalo do GLO, sendo que ambos foram a óbito por complicações de afecções gastrintestinais naturais.

Com relação à lesão laminar do casco, as maiores medianas observadas ocorreram no GLO, com  $p=0,001$  (Tabela 1) e, neste grupo, somente um cavalo

não demonstrou lesões em nenhum membro (Figura 1). A mediana dos escores de lesão laminar obtida no GLO foi 1, com erro padrão de 0,12. A mediana obtida no GSLO foi 0, com erro padrão de 0,13. Alguns cavalos do GSLO também demonstraram lesões laminares, no entanto, em quatro não verificou-se alteração laminar em nenhum membro (Figura 2). Somente quatro cavalos evidenciaram lesões laminares de escore 3, todos do GLO. Nestes cavalos, observou-se intensa destruição da arquitetura laminar, perda das interdigitações formadas entre as lâminas dérmicas e epidérmicas e aumento da distância entre o eixo queratinizado e a membrana basal.

Tabela 1 – Medianas e amplitude inter-quartis para os escores de lesão laminar e imunomarcacão para nitrotirosina e SOD2 laminar e SOD2 em múltiplos órgãos, nos grupos experimentais GSLO e GLO ( $p < 0,05$ ). Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa.

	<b>Lesões laminares</b>	<b>Imunomarcacão SOD2 em múltiplos órgãos</b>	<b>Imunomarcacão nitrotirosina laminar</b>	<b>Imunomarcacão SOD2 laminar</b>
<b>GSLO</b>	0 (0-0) a	1 (1-1) a	0 (0-0) a	0 (0-0) a
<b>GLO</b>	1 (0-1) b	2 (1-2) b	0 (0-1) a	0 (0-1) a

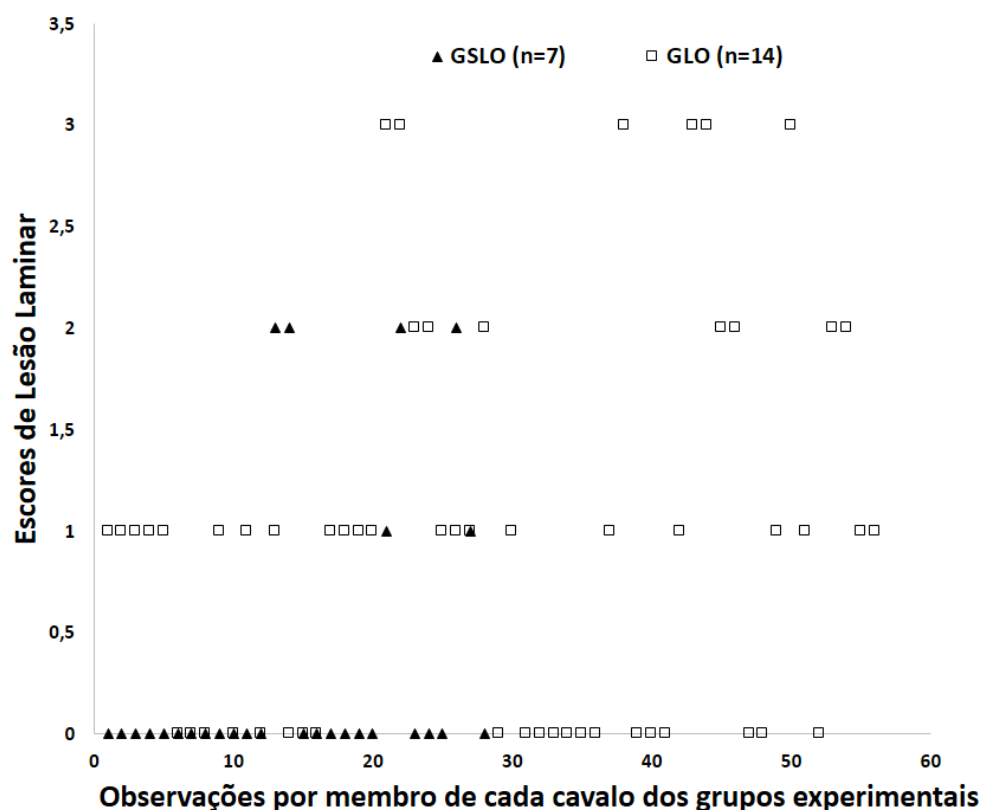


Figura 1. Gráfico de dispersão dos escores de lesão laminar dos cavalos dos grupos GSLO e GLO, cada animal com quatro membros.

### 5.3.3 Imunomarcacão para Nitrotirosina

A imunomarcacão em múltiplos órgãos para nitrotirosina foi considerada de fraca intensidade nos cavalos do GSLO, e observada no citoplasma de hepatócitos, no epitélio bronquiolar do pulmão, e em células cúbicas da região tubular renal. Nem todos os cavalos demonstraram imunomarcacão simultânea nos três órgãos. Nos cavalos do GLO, observou-se imunomarcacão moderada a intensa nos epitélios bronquiolar e alveolar e em macrófagos alveolares do pulmão; na região cortical e medular do rim; em hepatócitos e resíduos de nitrotirosina em sinusóides e vasos sanguíneos do fígado. Neste grupo (GLO) houve imunomarcacão também em cardiomiócitos e endotélio de vasos do coração; neurônio, leucócitos intravasculares no cérebro, e neurônios de Purkinje no cerebelo. A marcação de nitrotirosina nestes órgãos foi utilizada unicamente para definir os grupos experimentais (Figura 3).



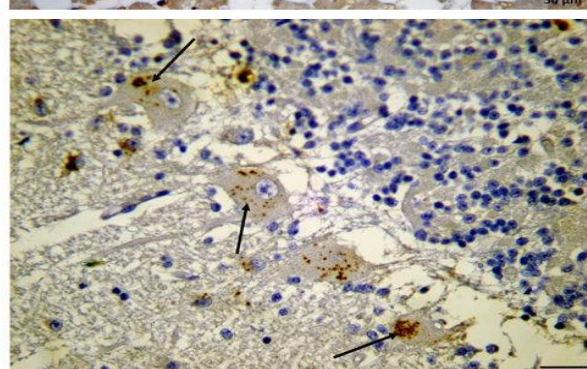
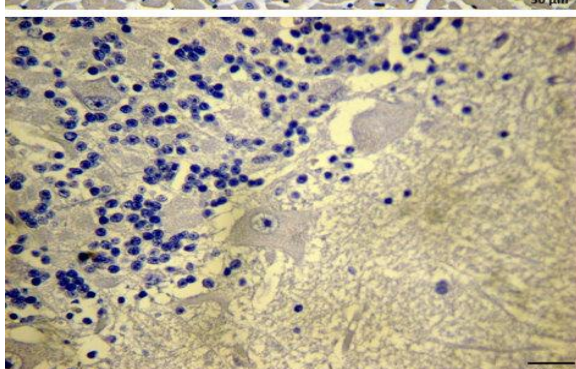
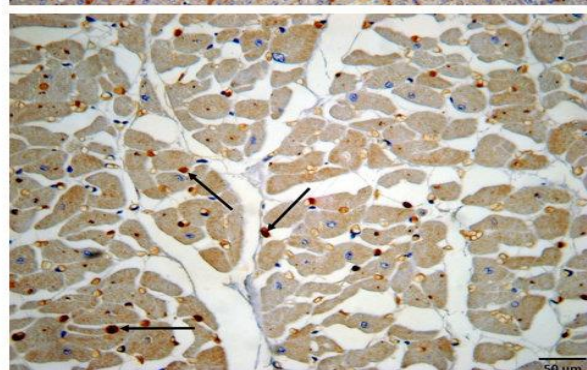
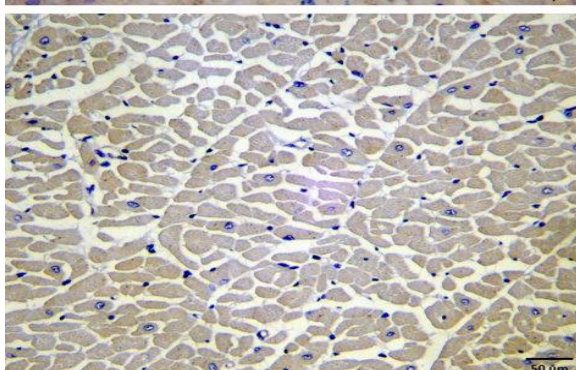
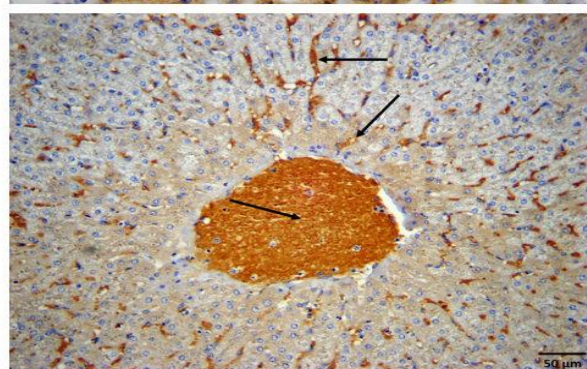
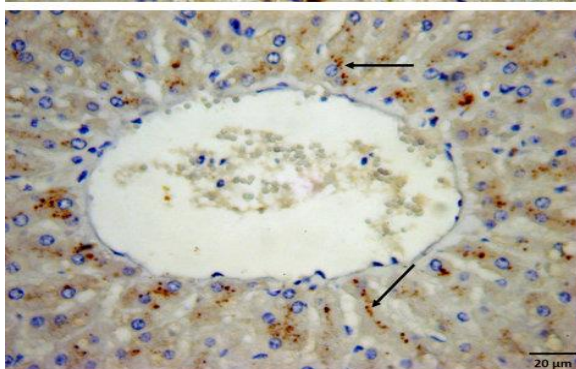
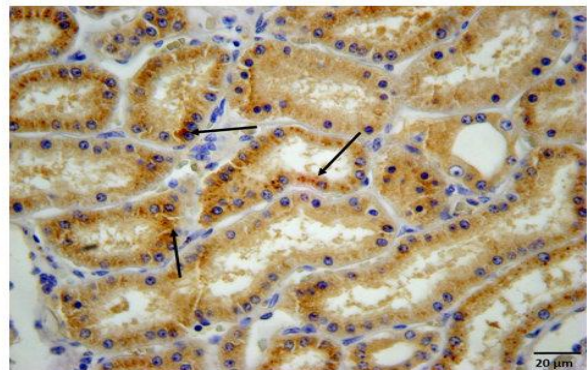
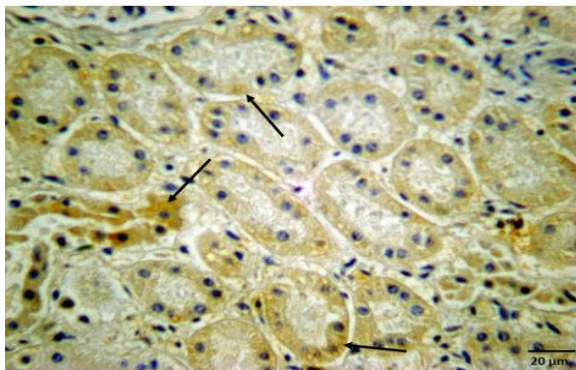
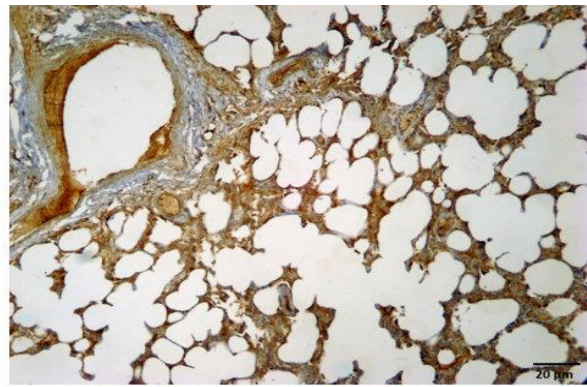
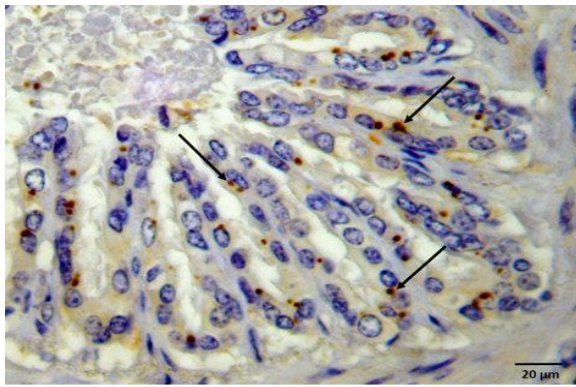




Figura 2 – Fotomicrografia dos órgãos de cavalos com doenças gastrintestinais. Imuno-histoquímica para nitrotirosina. A. Pulmão. A1. Observa-se imunomarcacão de fraca intensidade no citoplasma de células do epitélio bronquiolar (setas, GSLO). A2. Há intensa imunomarcacão no septo interalveolar (setas, GLO). B. Rim. B1. Imunomarcacão de fraca intensidade no citoplasma do epitélio tubular renal (setas, GSLO). B2. Forte imunomarcacão no citoplasma do epitélio tubular renal (setas, GLO). C. Fígado. C1. Imunomarcacão de fraca intensidade no citoplasma de hepatócitos (setas, GSLO). C2. Observa-se imunomarcacão de forte intensidade em sinusóides. Na veia centrolobular, há imunomarcacão de resíduos de nitrotirosina e células inflamatórias (setas, GLO). D. Coração. D1. Ausência de imunomarcacão em cardiomiócitos (GSLO). D2. Há imunomarcacão positiva em núcleo de cardiomiócitos (setas, GLO). E. Cerebelo. E1. Ausência de imunomarcacão entre as camadas granulosa, de neurônios de Purkinje e molecular do cerebelo (GSLO). E2. Observa-se imunomarcacão positiva no pericário dos neurônios de Purkinje e pelo neurópilo (GLO).

A imunomarcacão laminar para nitrotirosina foi observada na lâmina dérmica, no citoplasma e núcleo das células endoteliais e leucócitos, e também como resíduo de nitrotirosina teciduais ou dentro de vasos sanguíneos. A imunomarcacão para nitrotirosina no tecido laminar foi observada desde ausente até a intensidade forte. Dez cavalos não demonstraram imunomarcacão para nitrotirosina em nenhum membro, sendo quatro do GSLO e seis do GLO. Nove apresentaram escore 1, sendo três do GSLO e seis do GLO. Um cavalo evidenciou escore 2 em um membro, e um cavalo demonstrou escore 3 nos quatro membros, os dois do GLO. Não houve diferença entre as medianas de escore de imunomarcacão laminar para nitrotirosina entre os grupos experimentais, com  $p=0,14$  (Tabela 3). A mediana de escore de imunomarcacão para nitrotirosina laminar observada no GSLO foi 0, com erro padrão de 0,07, e a mediana de observada no GLO foi 0, com erro padrão de 0,11.

### 5.3.4 Imunomarcacão para SOD2

A imunomarcacão para SOD2 foi observada em todos os órgãos, com marcações teciduais em locais semelhantes para a nitrotirosina, porém de forma

mais disseminada. No pulmão, a principal marcação deu-se na área bronquial e bronquiolar; no rim na área tubular; no fígado, nos hepatócitos e sinusóides; no coração, no sarcoplasma de cardiomiócitos; em neurônios de Purkinje do cerebelo e neurônios cerebrais (Figura 4). As imunomarcações foram consideradas de intensidade moderada (escore 1), com áreas de imunomarcação mais concentradas; e de forte intensidade (escore 2), quando a imunomarcação foi observada disseminada no tecido avaliado. Cavalos do GLO demonstraram medianas de escore de imunomarcação em múltiplos órgãos para SOD2 superiores aos cavalos do GSLO, com  $p=0,01$  (Tabela 4). A mediana observada no GSLO foi 1, com erro padrão de 0,09, e no GLO a mediana foi 2, com erro padrão de 0,06.



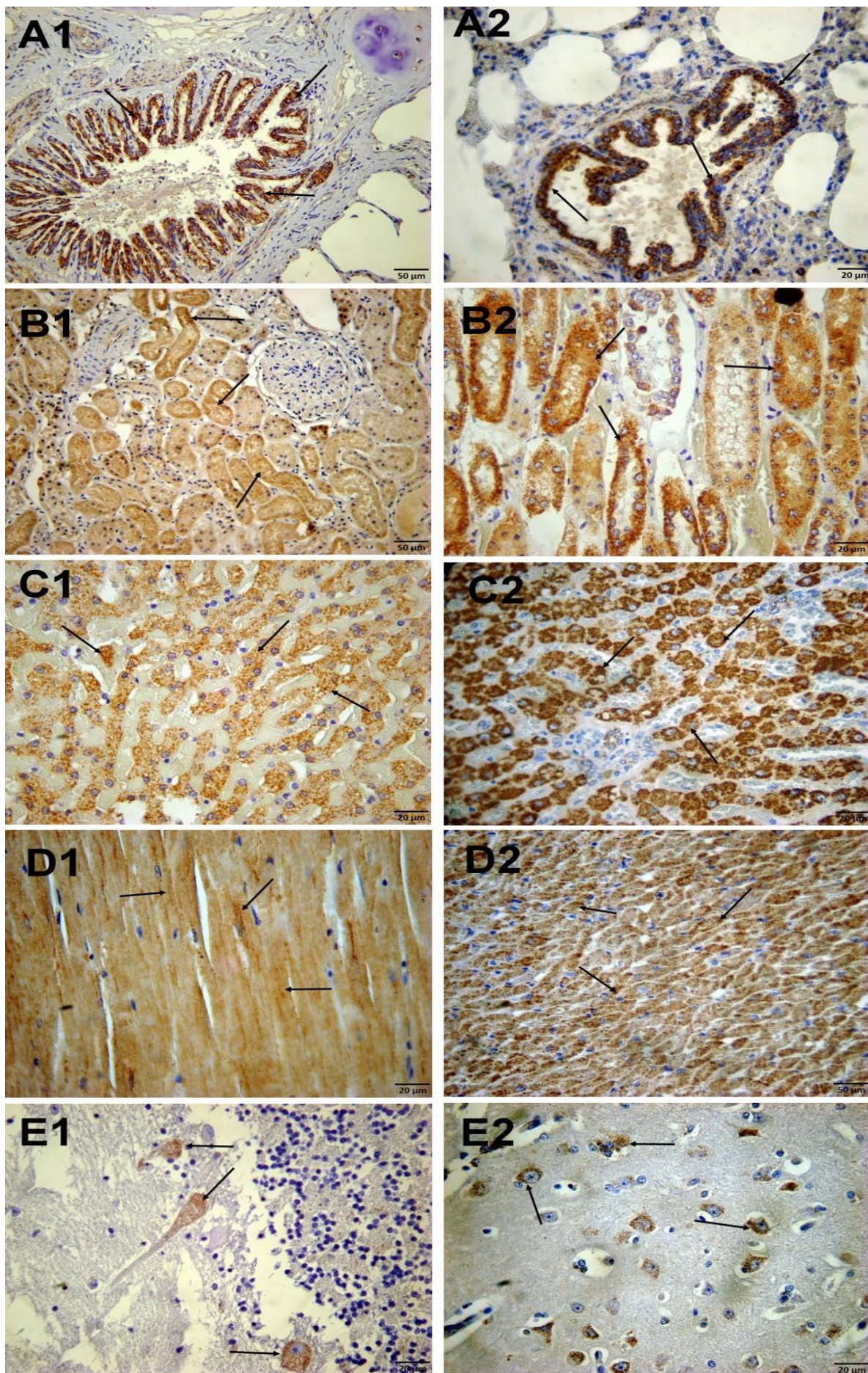




Figura 3 – Fotomicrografia dos órgãos de cavalos com doenças gastrintestinais. Imuno-histoquímica para SOD2. A Pulmão. Imunomarcacão de forte intensidade em epitélio bronquial (A1) e bronquiolar (A2, setas, GLO). B. Rim. B1. Imunomarcacão de moderada intensidade em epitélio tubular renal (setas, GSLO). B2. Imunomarcacão de forte intensidade em epitélio tubular renal (setas, GLO). C. Fígado. C1. Imunomarcacão de moderada intensidade em sinusóides (setas, GSLO). C2. Imunomarcacão de forte intensidade em sinusóides (setas, GLO). D. Coração. D1. Imunomarcacão de moderada intensidade em sarcoplasma (setas, GLO). D2. Imunomarcacão de forte intensidade em sarcoplasma (setas, GLO). E1. Cerebelo. Imunomarcacão de moderada intensidade em neurônios de Purkinje (setas, GLO). E2. Cérebro. Imunomarcacão de moderada intensidade em pericário de neurônios (setas, GLO).

A imunomarcacão para SOD2 laminar ocorreu no citoplasma celular, e foi considerada positiva na lâmina epidérmica. Não observou-se imunomarcacão para SOD2 no tecido laminar de doze cavalos, quatro do GSLO e oito do GLO. Sete cavalos obtiveram escore 1, dois pertencentes ao GSLO e cinco ao GLO. Dois cavalos demonstraram escore 2, um de cada grupo experimental. Nenhum animal deste estudo obteve escore 3 de imunomarcacão para SOD2. Não houve diferença entre as medianas dos grupos experimentais, com  $p=0,31$  (Tabela 4). A mediana de escore de imunomarcacão laminar para SOD2 do GSLO foi 0, com erro padrão de 0,10, e a mediana obtida no GLO foi 0, com erro padrão de 0,06.

#### 5.4 DISCUSSÃO

Considerou-se que os órgãos avaliados estavam sob intensa lesão oxidativa nos cavalos do GLO, confirmada pela imunomarcacão para nitrotirosina. O estresse oxidativo tem sido implicado no desenvolvimento de injúria tecidual em diversas afecções, como na injúria renal secundária a sepse (PATHAK *et al.*, 2012), disfunção em múltiplos órgãos causada pelo choque hemorrágico em rim, fígado, pulmão e intestinos (MOTA-FILIPPE, 1990), hepatotoxicidade pelo acetaminofen (KNIGHT *et al.*, 2002). O peroxinitrito, um potente agente oxidante, pode ser associado a lesão oxidativa pela imunomarcacão de nitrotirosina nos tecidos, como observado por Constantino *et*

*al.* (2014), em pulmões de ratos submetidos a sepse experimental. O peroxinitrito é formado pela reação entre o óxido nítrico e ânions superóxidos (BECKMAN *et al.*, 1994) e causa disfunção endotelial, hiporreatividade vascular, falência primária do miocárdio (SZABÓ, 1996) e inativação do transporte de elétrons na mitocôndria, prejudicando a respiração celular (RADI *et al.*, 1994). A imunomarcagem de fraca intensidade observada no pulmão, fígado e rim dos cavalos do GSLO foram consideradas como controle porque ocorre leve estresse oxidativo nestes órgãos, em animais saudáveis (HADDAD *et al.*, 1994; OTTESEN *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2015), e somente fortes imunomarcações estão associadas a lesão, como em doenças inflamatórias no pulmão (HADDAD *et al.*, 1994), no parênquima hepático (OTTESEN *et al.*, 2001), em células epiteliais tubulares na região medular e no cortex renal de ratos com endotoxemia experimental (XU *et al.*, 2015). No coração e sistema nervoso, no entanto, não há marcação para nitrotirosina em animais saudáveis (BODEGA *et al.*, 2006; SZABÓ *et al.*, 2012).

Neste estudo, cavalos com afecções gastrintestinais induzidas e naturais foram utilizados como modelo de indução de sepse e lesões laminares. O estudo da laminite, utilizando casos clínicos de cavalos acometidos por afecções gastrintestinais naturais, também foi realizado por Steelman *et al.* (2014), mesmo que existam variações entre a causa da doença e evolução clínica dos pacientes. Os cavalos com síndrome cólica podem desenvolver SRIS/sepse (PARSONS *et al.*, 2007; WYLIE *et al.*, 2012) que deflagra a lesão oxidativa em órgãos distantes da injúria intestinal, causando a falência de múltiplos órgãos (FINK 2002; GALLEY, 2010; ALKHARFY *et al.*, 2015). Epstein *et al.* (2011) determinaram que cerca de 30% dos cavalos atendidos com síndrome cólica desenvolvem SRIS, apresentando taquicardia, taquipneia, leucocitose ou leucopenia. A endotoxemia tem sido associada ao desenvolvimento de laminite em equinos, especialmente na síndrome cólica, mas a administração de endotoxinas não induz a laminite em cavalos saudáveis (TADROS; FRANK, 2012). Os principais estudos sobre sepse, entretanto, utilizam a ligadura e punção cecal em animais de laboratório para verificar a SRIS de forma mais abrangente, uma vez que a resposta inflamatória sistêmica pode ser desencadeada por processos mais complexos, como a injúria em múltiplos órgãos (ZENG *et al.*, 2015).

Os cavalos do GLO, que encontravam-se em estresse oxidativo sistêmico com forte imunomarcção para nitrotirosina em fígado, rim, pulmão, tecido nervoso e coração, demonstraram lesões laminares mais graves. Sendo assim, sugere-se que o desenvolvimento da laminite está associado ao status oxidativo sistêmico. Belknap *et al.* (2009) sugeriram que a laminite tem similaridades com a falência de múltiplos órgãos que ocorre na sepse humana, o que corrobora com os resultados deste estudo, que demonstrou lesões laminares mais graves em cavalos sob estresse oxidativo sistêmico e que pode resultar em falência de múltiplos órgãos. Resultado similar foi demonstrado por Stewart *et al.* (2009) e Tadros *et al.* (2012), que observaram que somente os cavalos que desenvolveram laminite clínica após administração de oligofrutose ou extrato de noqueira preta apresentaram resposta inflamatória também em órgãos como fígado e pulmão.

Burns *et al.* (2011) não observaram aumento de imunomarcção para nitrotirosina laminar em cavalos com laminite induzida experimentalmente por sobrecarga de carboidratos e extrato de noqueira preta. No estudo atual, observou-se imunomarcção de nitrotirosina em alguns cavalos, no entanto, não houve diferença entre os grupos experimentais, o que demonstra que o peroxinitrito possa estar envolvido no agravamento da lesão em cavalos com afecções gastrintestinais, não sendo, no entanto, o principal oxidante desencadeador, uma vez que não houve aumento de marcação nos cavalos com lesões laminares mais graves.

A SOD é um antioxidante que converte os ânions superóxidos, impedindo a formação de peroxinitritos. No entanto, o aumento isolado de SOD tecidual não é suficiente para impedir a lesão oxidativa, pois outros antioxidantes são necessários para degradar os produtos da sua ação, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que é um potente oxidante, degradado pela catalase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). A sepse causa o aumento desigual da SOD com relação à catalase, o que agrava ainda mais o estresse oxidativo (VISNER *et al.*, 1990; ANDRADES *et al.*, 2005; ANDRADES *et al.*, 2011). Neste estudo, todos os cavalos apresentaram imunomarcção em múltiplos órgãos para a SOD2. Os cavalos com estresse oxidativo sistêmico apresentaram maior imunomarcção para a SOD2 em múltiplos órgãos, o que corrobora com os achados de aumento deste antioxidante em condições de resposta inflamatória

sistêmica, especialmente desencadeada pela sepse (CONSTANTINO *et al.*, 2014; GIMENEZ-GARZO *et al.*, 2015). A SOD2 presente no tecido laminar do casco dos cavalos deste estudo foi observada em intensidades que variaram entre os animais, e não houve diferença entre os grupos experimentais. A SOD só é observada no tecido laminar do casco no período de desenvolvimento da laminite (LOFTUS *et al.*, 2007; NOSCHKA *et al.*, 2009), e diferente do que ocorre em outros órgãos, como fígado, pulmão e pele, não se observa SOD laminar em cavalos saudáveis (LOFTUS *et al.*, 2007). Desta forma, observa-se que o tecido laminar falhou em responder com aumento de antioxidantes ao estímulo oxidativo sistêmico, como ocorreu nos demais órgãos.

Acredita-se que o tecido laminar do casco seja mais susceptível às lesões na falência de múltiplos órgãos, quando comparado a outros órgãos, devido à maior expressão de citocinas inflamatórias, menor capacidade antioxidante e ao estresse físico ocasionado pelo tracionamento exercido pelas estruturas locomotoras, fato que não ocorre em nenhum outro órgão (BELKNAP *et al.*, 2009; STEWART *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2009). O tecido laminar reside em ambiente profundamente hipoxêmico, e esta hipóxia se agrava na fase de desenvolvimento da laminite, o que pode explicar, também, porque este tecido é mais susceptível às lesões secundárias à SRIS/sepse (PAWLAK *et al.*, 2013). Neste estudo, observou-se que os cavalos com estresse oxidativo em múltiplos órgãos desenvolvem lesões laminares mais graves. Como já discutido, outras substâncias, que não o peroxinitrito, podem estar envolvidas no mecanismo de injúria laminar em cavalos, que ocorre conjuntamente à disfunção de múltiplos órgãos, mas que apresenta repercussões laminares mais graves devido às características inerentes deste tecido. Outro ponto a se considerar, é que apesar de haver forte estresse oxidativo sistêmico, somente dois cavalos demonstraram lesão em órgãos, nos demais não foram observadas alterações microscópicas, diferente do observado no tecido laminar, em que pelo menos quatro cavalos com lesão laminar de grau 3 provavelmente apresentariam quadro clínico de laminite caso sobrevivessem.

## 5.5 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo sistêmico contribui para o desenvolvimento de lesões laminares mais graves em cavalos com afecções gastrintestinais. O tecido laminar não eleva a expressão de superóxido dismutase, como os outros órgãos, frente ao estresse oxidativo sistêmico.

## REFERÊNCIAS

- ALKHARFY, K.M.; AHMAD, A.; RAISH, M.; VANHOUTTE, P.M. Thymoquinone modulates nitric oxide production and improves organ dysfunction of sepsis. **Life Sciences**, v.143, p.131-138, 2015.
- ANDRADES, M.; RITTER, C.; MOREIRA, J.C.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. **Journal of Surgical Research**, v.125, n.1, p. 68-72, 2005.
- ANDRADES, M.; RITTER, C.; OLIVEIRA, STRECK, E.L.; MOREIRA, C.F.; DAL-PIZZOL, F. Antioxidant Treatment Reverses Organ Failure in Rat Model of Sepsis: Role of Antioxidant Enzymes Imbalance, Neutrophil Infiltration, and Oxidative Stress. **Journal of Surgical Research**, v. 167, p. 307-313, 2011.
- BECKMAN, J.S.; CHEN, J.; ISCHIROPOULOS, H.; CROW, J.E. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 229-240, 1994.
- BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N.; CROUSER, E.C. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 155-157, 2009.
- BERG, K.; WISETH, R.; BJERVE, K.; BRUROK, H.; GUNNES, S.; SKARRA, S.; JYNGE, P.; BASU, S. Oxidative stress and myocardial damage during elective percutaneous coronary interventions and coronary angiography. A comparison of blood-borne isoprostane and troponin release. **Free Radical Research**, v. 38, p. 517-525, 2004.
- BODEGA, S.G.; ARILLA, E.; FELIPO, V.; FERNÁNDEZ, B. The expression. of nNOS, iNOS and nitrotyrosine is increased in the rat cerebral cortex in experimental hepatic encephalopathy. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, p. 594-604, 2006.
- BURNS, T.A.; WESTERMAN, T.; NUOVO, G.J.; WATTS, M.R.; PETTIGREW, A.; YIN, C.; BELKNAP, J.K. Role of Oxidative Tissue Injury in the Pathophysiology of Experimentally Induced Equine Laminitis: A Comparison of two Models. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 540-548, 2011.



CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G.A.; CATZ, S.D.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Letters**, v. 341, p. 65-68, 1994.

COGGER, V.C.; MULLER, M.; FRASER, R.; MCLEAN, A.J.; KHAN, J.; COUTEUR, D.L. The effects of oxidative stress on the liver sieve. **Journal of Hepatology**, v. 41, p. 370-376, 2004.

CONSTANTINO, L.; GONÇALVES, R.C.; GIOMBELLI, V.R.; TOMASI, C.D.; VUOLO, F.; KIST, L.W.; DE OLIVEIRA, G.M.; PASQUALI, M.A.; BOGO, M.R.; MAUAD, T.; HORN, A.JR.; MELO, K.V.; FERNANDES, C.; MOREIRA, J.C.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. Regulation of lung oxidative damage by endogenous superoxide dismutase in sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v.1, p.2-17, 2014.

DE LAAT, M.A.; KYAW-TANNER, M.T.; SILLANCE, M.N.; MCGOWAN, C.M.; POLLITT, C.C. Advanced glycation end products in horses with insulin-induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, p. 395-401, 2012.

EPSTEIN, K.L.; BRAINARD, B.M.; GOMEZ-IBANEZ, S.E.; LOPES, M.A.; BARTON, M.H.; MOORE, J.N. Thrombelastography in horses with acute gastrointestinal disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n.2, p. 307-314, 2011.

FALEIROS, R.R.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.J.; MESSER, N.T.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Lamellar leukocyte accumulation in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 107-115, 2011.

FINK, M.P. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.5, n.2, p.167-174, 2002.

FONTAINE, G.L.; BELKNAP, J.K.; ALLEN, D.; MOORE, J.N.; KROLL, D.L. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 714–720, 2001.

GALLEY, H.F. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. **Critical Care** v. 14, n.4, p. 230, 2010.

GIMENEZ-GARZO, C.; URIOS, A.; AGUSTI, A.; GONZALEZ-LOPEZ, O.; ESCUDERO-GARCIA, D.; ESCUDERO-SANCHIS, A.; SERRA, M.A.; GINER-DURAN, R.; MONTOLIU, C.; FELIPO, V. Is Cognitive Impairment in Cirrhotic Patients Due to Increased Peroxynitrite and Oxidative Stress? **Antioxidants & Redox Signaling**, v.22, n. 10, p. 871-877, 2015.

HADDAD, I.Y.; HU, G.P.P.; GALLIANI, C.; BECKMAN, J.S.; MATALON, S. Quantitation of Nitrotyrosine Levels in Lung Sections of Patients and Animals with Acute Lung Injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 2407-2413, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free radical in biology and medicine**, v.18, p. 125-126, 1995.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letters**, v. 364, p. 279-282, 1995.

JOHNSON, P.J. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.18, n. 2, p.271-293, 2002

KNIGHT, T.R.; HO, Y.S.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 468-475, 2002.

KONG, X.; ZHANG, Y.; WU H.; LI, F.; ZHANG, D.; SU, Q. Combination Therapy with Losartan and Pioglitazone Additively Reduces Renal Oxidative and Nitrate Stress Induced by Chronic High Fat, Sucrose, and Sodium Intake. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.A.; CASTRO, M.L.; ARAUJO, F.F.; SILVA, J.R.; BASSO, F.Z.; DORNBUSCH, P.T.; DECONTO, I.; SOUSA, R.S. Histopathological hoof lamellar changes in horses with Pituitary pars intermedia adenoma: cases report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.5, p.1226-1230, 2015a.

LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.A.; DECONTO, I.; GONÇALVES, K.A.; MONTIANI-FERREIRA, F.; BRUM, J.S.; DE BRITO, H.F.; DE SOUSA, R.S. Systemic leukopenia, evaluation of lamellar leukocyte infiltration and lamellar lesions in horses with naturally occurring colic syndrome. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 15-21, 2015b.

LASKOSKI, L.M.; LOCATELLI DITTRICH, R.; VALADÃO, C.A.A.; BRUM, J.S.; BRANDÃO, Y.O.; DE BRITO, H.V.; SOUSA, R.S. Oxidative stress em hoof lamellar tissue of horses with lethal gastrointestinal diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2016, in press.

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; STANKIEWICZ, K.M.; BLACK, S.J. Lamellar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, p. 48-53, 2006.

LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; PETTIGREW, A.; ABRAHAMSEN, E.J.; BELKNAP, J.K. Early laminar events involving endothelial activation in horses with black walnut-induced laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.11, p.1205-1211, 2007.

MACDONALD, J.H.F.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, p. 221-232, 2003.

MOTA-FILIPE, H.; MCDONALD, M.C.; CUZZOCREA, S.; THIEMERMANN, C.A. membrane-permeable radical scavenger reduces the organ injury in hemorrhagic shock. **Shock**, v. 12, n. 4, p. 255-261, 1990.

NOLAN, J.P.; CAMARA, D.S. The importance of intestinal endotoxins in liver disease. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 189, p. 347-367, 1985.

NOSCHKA, E.; VANDENPLAS, M.L.; HURLEY, D.J.; MOORE, J.N. Temporal aspects of laminar gene expression during the developmental stages of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 242-253, 2009.

OTTESEN, L.H.; HARRY, D.; FROST, M.; DAVIES, S.; KHAN, K.; HALLIWELL, B.; MOORE, K. Increased formation of S-nitrothiols and nitrotyrosine in cirrhotic rats during endotoxemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 6, p. 790-798, 2001.

PARSONS, C.S.; ORSINI, J.A.; KRAFTY, R.; CAPEWELL, L.; BOSTON, R. Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, p. 885–889, 2007.

PATHAK, E.; MACMILLAN-CROW, L.A.; MAYEUX, P.R. Role of Mitochondrial Oxidants in an In Vitro Model of Sepsis-Induced Renal Injury. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 1, p. 192-201, 2012.

PAWLAK, E.A.; GEOR, R.J.; WATTS, M.R.; BLACK, S.J.; JOHNSON, P.J.; BELKNAP, J.K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and related genes in equine digital lamellae and in cultured keratinocytes. **Equine Veterinary Journal**, v.46, p.203-209, 2013.

POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 38-46, 1996.

RADI, R.; RODRIGUEZ, M.; CASTRO, L.; TELLERI, R. Inhibition of mitochondria1 electron transport by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 89-95, 1994

RIGGS, L.M.; FRANCK, T.; MOORE, J.N.; KRUNKOSKY, T.M.; HURLEY, D.J.; PERONI, J.F.; DE LA REBIERE, G.; SERTEYN, D.A. Neutrophil myeloperoxidase measurements in plasma, laminar tissue, and skin of horses

given black walnut extract. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 81–86, 2007.

STEELMAN, S.M.; JOHNSON, P.; JACKSON, A.; SCHULZE, J.; BHANU P, B. CHOWDHARY. Serum metabolomics identifies citrulline as a predictor of adverse outcomes in an equine model of gut-derived sepsis. **Physiological Genomics**, v. 46, p. 339-347, 2014.

SZABÓ, C: The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 6, p. 79-88, 1996

SZABÓ, G.; LOGANATHAN, S.; MERKELY, B.; GROVES, J.T.; KARCK, M.; SZABÓ, C.; RADOVITS, T. Catalytic peroxynitrite decomposition improves reperfusion injury after heart transplantation. **Cardiothoracic Transplantation**, v. 143, n. 6, p. 1443-1449, 2012.

STEWART, A.J.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A.M.; BELKNAP, J.K. Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract modelo of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, n.3-4, p. 254-260, 2009.

TADROS, E.M.; FRANK, N. Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 9, p. 1394-1402, 2012.

TADROS, E.M.; FRANK, N.; NEWKIRK, K.M.; DONNELL, R.L.; HOROHOV, D.W. Effects of a “two-hit” model of organ damage on the systemic inflammatory response and development of laminitis in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 150, p. 90-100, 2012.

TANAKA, K.; SHIRAI, T.; NAGATA, E.; DEMBO, T.; FUKUUCHI, Y. Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. **Neuroscience Letters**, v. 235, p. 85-88, 1997.

VISNER, G.A.; DOUGALL, W.C.; WILSON, J.M.; BURR, I.A.; NICK, H.S. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 5, p. 2856-2864, 1990.

XU, S.; CHEN, Y.; TAN, Z.; XIE, D.; ZHANG, C.; XIA, M.; WANG, H.; ZHAO, H.; XU, D.; YU, D. Vitamin D3 pretreatment alleviates renal oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 152, p. 133-141, 2015.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A.V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, v. 5, p. 472-484, 2015.

WYLIE, C.E.; COLLINS, S.N.; VERHEYEN, K.L.; NEWTON, J.R. Risk factors for equine laminitis: a systematic review with quality appraisal of published evidence. **Veterinary Journal**, v. 193, p. 58–66, 2012.

YIN, C.; PETTIGREW, A.; LOFTUS, J.P.; BLACK, S.J.; BELKNAP, J.K. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 211-215, 2009.

ZENG, M.; HE, W.; LI, L.; LI, B.; LUO, L.; HUANG, X.; GUAN, K.; CHEN, W.; Ghrelin Attenuates Sepsis-Associated Acute Lung Injury Oxidative Stress in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 683-690, 2015.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

A leucopenia em cavalos com síndrome cólica está relacionada ao aumento da infiltração leucocitária laminar, o que pode induzir ou agravar as lesões laminares.

Nos cavalos com síndrome cólica ocorre aumento de nitrotirosina e de superóxido dismutase no tecido laminar, indicando que o estresse oxidativo por peroxinitrito pode estar envolvido no agravamento da laminite;

O aumento de lesões laminares em cavalos do GLO sugere que o estresse oxidativo sistêmico está envolvido na fisiopatogenia da laminite secundária a síndrome cólica; o estresse oxidativo sistêmico promove aumento do antioxidante SOD somente nos órgãos e não no tecido laminar.

Cavalos com síndrome cólica e estresse oxidativo sistêmico secundário à SRIS, cuja presença de leucopenia representa um sinal clínico, são os mais propensos a desenvolver lesões laminares e apresentar laminite clínica.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A laminite é observada com frequência após episódios de síndrome cólica em equinos. Desta forma, a utilização de cavalos com doenças gastrintestinais representa um modelo experimental importante para o estudo da afecção, podendo contribuir diretamente para o entendimento do mecanismo de desenvolvimento da laminite inflamatória, especialmente porque os modelos tradicionais de indução de laminite apresentam diferenças importantes quanto a seus resultados.

Considerando que cavalos com síndrome cólica e leucopenia demonstram aumento da infiltração leucocitária laminar, medidas terapêuticas preventivas podem ser adotadas, como a crioterapia para tentar minimizar os efeitos deletérios das substâncias liberadas pelas células inflamatórias no tecido laminar do casco no momento em que a leucopenia seja identificada. A ausência de lesões laminares mais graves nestes animais leucopênicos é mais um indicativo de que esta condição pode ser considerada como anterior ao desenvolvimento da laminite nos cavalos com síndrome cólica, marcando o início da adoção de medidas preventivas.

Este foi o primeiro estudo que demonstrou a presença da nitrotirosina em cavalos com lesão no tecido laminar do casco, e a associação de lesão oxidativa em múltiplos órgãos com a gravidade de lesões laminares, contribuindo para demonstrar a relação entre laminite e falência de múltiplos órgãos. A ausência de SOD2 laminar em cavalos saudáveis, reduzida expressão após estresse oxidativo sistêmico e características inerentes do tecido laminar do casco provavelmente fazem com que este tecido seja o mais acometido pela SRIS decorrente de afecções gastrintestinais, motivos pelos quais muitos cavalos que sobrevivem à síndrome cólica desenvolvem laminite como sequela, e não disfunção em múltiplos órgãos. O estresse oxidativo é um processo complexo, envolvendo diversas substâncias, e possivelmente outros antioxidantes e radicais livres também estão envolvidos na fisiopatogenia da laminite.

Uma vez que o estresse oxidativo pode ser o causador das lesões laminares, estudos posteriores utilizando antioxidantes que podem atenuar ou prevenir esta complicação, podem ser muito úteis nas fases prodrômicas e agudas da laminite em cavalos com afecções gastrintestinais. É importante

salientar que tratamentos que controlem os efeitos deletérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, muito estudada principalmente na medicina de seres humanos, devem ser pesquisados também na medicina equina como potenciais terapias preventivas para a laminite em cavalos não só com síndrome cólica, mas também outras afecções que deflagrem a SRIS.





**Universidade Federal do Paraná**  
**Setor de Ciências Agrárias**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA**

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 038/2012, referente ao projeto “Perfis hematológicos e bioquímicos, alterações histopatológicas e infiltração neutrofílica tecidual relacionados às alterações morfológicas do tecido laminar do casco de cavalos com síndrome cólica letal de ocorrência natural”, sob a responsabilidade de Luciane Maria Laskoski, na forma em que foi apresentado (uso de 30 animais), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 30 de novembro de 2012.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 038/2012, regarding the project “Hematological and biochemical profiles, histopathological alterations, tissue neutrophil infiltration correlated to morphologic alteration in hoof laminar tissue of horses with lethal syndrome colic of natural occurrence”, under the charge of Luciane Maria Laskoski, in the terms it was presented (use of 30 animals), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on November 30, 2012.

Curitiba, 30 de novembro de 2012.

Patrick Schmidt  
 Presidente

Rosângela Locatelli Dittrich  
 Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Setor de Ciências Agrárias  
 Universidade Federal do Paraná.

## VITA

**LUCIANE MARIA LASKOSKI** – nasceu na cidade de Curitiba, PR, no dia 18 de abril de 1981, filha de João Laskoski e Leonor Madalena Laskoski. Em janeiro de 2005, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná, Campus de Curitiba. Participou como Aprimoranda do Programa de Aprimoramento (Residência) em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica de Grandes Animais, nos anos de 2005 e 2006, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, câmpus de Jaboticabal. Em abril de 2009 concluiu o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, câmpus de Jaboticabal. Entre maio de 2009 a julho de 2012 foi professora das disciplinas de Clínica Médica de Grandes Animais, Semiologia Veterinária, Bovinocultura de Corte e Leite, Equideocultura e Práticas Hospitalares na Clínica Médica de Grandes Animais na Universidade de Cuiabá, MT. Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Paraná, no curso de Doutorado.